

535,545

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 juillet 2004 (29.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/063376 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/29, C07K 14/415, 16/16, A61K 38/16

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003629

(22) Date de dépôt international :
9 décembre 2003 (09.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/15563 10 décembre 2002 (10.12.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SO-
CIE TE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'AP-
PLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.) [FR/FR];
Société par Actions Simplifiée, 42 rue du Docteur Blanche,
F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : FERRAN-
DIS, Eric [FR/FR]; 74, avenue Guy de Coubertin, F-78470
Saint Rémy les Chevreuse (FR).

(74) Mandataire : BOURGOUIN, André; IPSEN -
S.C.R.A.S., Direction de la Propriété Industrielle, 24
rue Erlanger, F-75781 Paris Cedex 16 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING RECOMBINANT HETEROCARPINE

(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION D'HETEROCARPINE RECOMBINANTE

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing recombinant heterocarpine. The invention concerns in particular the complete heterocarpine sequence (SEQ. ID. NO. 10), expression vectors comprising a polynucleotide encoding heterocarpine, host cells transformed or transfected by said expression vectors and a method for obtaining heterocarpine using said transformed or transfected host cells. The resulting recombinant heterocarpine can in particular be used for preparing a medicine for treating cancer.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante. La séquence complète de l'hétérocarpine (SEQ. ID. NO. 10), des vecteurs d'expression comprenant un polynucléotide codant pour l'hétérocarpine, des cellules hôtes transformées ou transfectées par lesdits vecteurs d'expression ainsi qu'un procédé d'obtention d'hétérocarpine au moyen desdites cellules hôtes transformées ou transfectées sont notamment décrits. L'hétérocarpine recombinante obtenue selon l'invention peut notamment être utilisée pour préparer un médicament destiné à traiter le cancer.

WO 2004/063376 A1

Procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante

L'invention a pour objet un procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante.

L'hétérocarpine est une protéine aux propriétés anti-cancéreuses décrite pour la première fois par la demanderesse dans la demande de brevet PCT WO 02/068461. Cette protéine isolée possède une masse moléculaire d'environ 90,9 kDa, comporte les
5 fragments de séquences peptidiques SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 et SEQ. ID. NO. 3 (voir la partie de la description réservée à la liste des séquences) et est susceptible d'être obtenue par extraction de cellules de plante *Pilocarpus heterophyllus* cultivées *in vitro* comme décrit dans la demande de brevet susmentionnée. Toutefois, la séquence complète de cette protéine restait inconnue à ce jour dans la mesure où le
10 clonage n'avait pas été effectué.

La présente demande décrit à présent des polynucléotides pouvant servir d'amorce pour le clonage de l'hétérocarpine, l'ADN codant pour l'hétérocarpine, l'ARNm correspondant à l'hétérocarpine, des vecteurs d'expression contenant ledit ARNm, des cellules hôtes transformées ou transfectées avec ces vecteurs de même qu'un procédé de
15 préparation d'hétérocarpine recombinante.

La présente invention a donc d'abord pour objet un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8. De préférence, ledit polynucléotide isolé consiste en la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8.

Elle a aussi pour objet un polynucléotide anti-sens comprenant la séquence
20 complémentaire à celle dudit polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8. De préférence, ledit polynucléotide anti-sens consiste en la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8.

L'invention concerne également un polynucléotide isolé comprenant la séquence
25 polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière, ledit polynucléotide étant tel qu'il code pour un polypeptide ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polynucléotide isolé est tel qu'il consiste en la séquence polynucléotidique
30 SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière.

En particulier, l'invention concerne à ce titre le polynucléotide isolé de séquence nucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou le polynucléotide isolé de séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

5 L'hétérocarpine, autrement dit la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10, est codée par le fragment du polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 contenu entre les bases aux positions 115 (codon initiateur ATG codant pour une méthionine) et 2437 (codon stop UAA), i.e. par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

10 L'invention concerne donc encore un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière ou bien la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un des fragments de cette dernière, le polypeptide codé par ledit polynucléotide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit vecteur d'expression
15 comprendra la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

L'invention concerne de même une cellule hôte transformée ou transfectée avec ledit vecteur d'expression.

20 L'invention concerne aussi un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera
25 la séquence SEQ. ID. NO. 14.

L'invention a également pour objet un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé tel que décrit précédemment, et en particulier un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14
30 mais pas la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10.

L'invention concerne aussi, à titre de médicament, un polynucléotide isolé comprenant :

- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou
- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments,

ledit polynucléotide isolé étant tel qu'il code pour un polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire.

De préférence, le polynucléotide isolé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments.

En particulier, ledit polynucléotide isolé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

Par ailleurs, ledit polynucléotide isolé utilisé en tant que médicament sera de préférence présent dans un vecteur viral, ledit vecteur viral étant par exemple sélectionné à partir du groupe consistant en un adénovirus, un adénovirus associé, un rétrovirus et un pox virus.

L'invention concerne aussi, à titre de médicament, un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera la séquence SEQ. ID. NO. 14.

L'invention concerne encore, à titre de médicament, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit anticorps monoclonal ou ledit fragment de l'antigène de celui-ci fixe spécifiquement un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière. Plus préférentiellement encore, ledit anticorps monoclonal ou ledit fragment de l'antigène de celui-ci fixe spécifiquement un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la

séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

Un autre objet de l'invention sera une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polynucléotide isolé comprenant :

- 5 - la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou
- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments,

ledit polynucléotide isolé étant tel qu'il code pour un polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire,

- 10 avec un ou des excipients pharmaceutiquement acceptables.

De préférence, le polynucléotide isolé servant de principe actif consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments.

- 15 En particulier, le polynucléotide isolé servant de principe actif consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

- Ledit polynucléotide isolé incorporé dans une composition pharmaceutique selon l'invention sera de préférence présent dans un vecteur viral, ledit vecteur viral étant par
20 exemple sélectionné à partir du groupe consistant en un adénovirus, un adénovirus associé, un rétrovirus et un pox virus.

- L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique comprenant un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou
25 biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera la séquence SEQ. ID. NO. 14.

- L'invention aura de plus pour objet une composition pharmaceutique comprenant un
30 anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé comprenant au moins un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9, ledit polypeptide

- isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite composition comprenant par ailleurs un ou des excipients pharmaceutiquement acceptables. De préférence, ladite composition pharmaceutique selon l'invention sera telle qu'elle comprenne un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière.
- 10 En particulier, l'invention concernera une composition pharmaceutique comprenant un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10) avec un ou des excipients pharmaceutiquement acceptables.
- 15

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un polynucléotide isolé comprenant :

- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments, ou
- la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments,

ledit polynucléotide isolé étant tel qu'il code pour un polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.

20

De préférence, le polynucléotide isolé utilisé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un de ses fragments.

25

En particulier, le polynucléotide isolé utilisé consistera en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 8 ou en le polynucléotide de séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9.

Ledit polynucléotide isolé utilisé est de préférence présent dans un vecteur viral, ledit vecteur viral étant par exemple sélectionné à partir du groupe consistant en un adénovirus, un adénovirus associé, un rétrovirus et un pox virus.

30

La présente invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide isolé comprenant un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments, ledit

polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative. De préférence, ledit polypeptide isolé consistera en un polypeptide de
5 séquence SEQ. ID. NO. 14 ou en un de ses fragments. En particulier, ledit polypeptide possèdera la séquence SEQ. ID. NO. 14.

Alternativement, toujours selon la présente invention, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9
10 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, pourra être utilisé pour préparer un
15 médicament destiné à traiter une maladie proliférative. De préférence, ledit anticorps monoclonal ou ledit fragment de l'antigène de celui-ci fixera spécifiquement un polypeptide consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments
20 de cette dernière.

En particulier, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement un polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, un anticorps monoclonal, ou un
25 fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10), pourra être utilisé pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.

Selon des variantes préférées des utilisations susmentionnées, la maladie proliférative à traiter par le polypeptide ou le polynucléotide décrits précédemment sera un cancer.
30 Selon des variantes encore plus préférées, le cancer sera choisi parmi le groupe consistant en le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon (et en particulier le cancer du poumon à petites cellules) et le cancer colorectal. Seront encore plus particulièrement préférés le cancer du sein et le cancer du poumon à petites cellules.

35 L'invention offre de plus une méthode de préparation d'un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou

SEQ. ID. NO. 13 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite méthode de
5 préparation comprenant les étapes successives suivantes :

(a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou
10 SEQ. ID. NO. 13, la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou encore un des fragments de ces dernières, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et

15 (b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.

De préférence, ladite méthode de préparation concernera la préparation d'un polypeptide isolé consistant en la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments
20 de cette dernière, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite méthode de préparation comprenant les étapes successives suivantes :

(a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou
25 SEQ. ID. NO. 13, la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou encore un des fragments de ces dernières, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et
30

(b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.

En particulier, ladite méthode aura pour objet la préparation du polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou par la
35 séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou

SEQ. ID. NO. 13 (autrement dit, la préparation de la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

Selon une variante encore plus préférée de ladite méthode, celle-ci concernera la préparation de la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10 et comprendra les étapes
5 suivantes :

(a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou
10 SEQ. ID. NO. 13 ou la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et

(b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.

La présente invention offre encore une méthode pour l'identification de composés
15 susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire, laquelle comprend les étapes successives suivantes :

(a) mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant pour permettre à l'agent candidat de se fixer au polypeptide, avec un polypeptide isolé comprenant :

20 - soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,

- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique
25 SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,

ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et

(b) détection de la fixation de chaque composé candidat audit polypeptide et
30 identification, parmi les composés candidats, des composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire.

En particulier, ladite méthode pour l'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire comprendra, dans son étape (a), la mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un

temps suffisant pour permettre à l'agent candidat de se fixer au polypeptide, avec le polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, avec la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

- 5 Une méthode alternative pour l'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire comprend les étapes successives suivantes :

- (a) mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant pour permettre à l'agent candidat et à la cellule d'interagir, avec une
10 cellule capable d'exprimer un polypeptide isolé comprenant :

- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,
- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique
15 SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,

ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire, et

- 20 (b) détermination de l'effet de chaque composé candidat sur la concentration cellulaire en polypeptide et identification, parmi les composés candidats, des composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire.

En particulier, ladite méthode alternative comprendra, dans son étape (a), la mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant
25 pour permettre à l'agent candidat et à la cellule d'interagir, avec une cellule capable d'exprimer le polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, une cellule capable d'exprimer la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).

- 30 Selon des modes d'exécution préférés des méthodes d'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire décrites ci-dessus, les composés candidats proviendront de bibliothèques de petites molécules issues de programmes de chimie combinatoire.

Les propriétés pharmacologiques obtenues pour les polynucléotides et polypeptides selon l'invention rendent ces derniers aptes à une utilisation pharmaceutique. En effet, les polypeptides isolés comprenant :

- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,
 - soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,
- 10 qui ont au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ainsi que les polynucléotides codant pour lesdits polypeptides, peuvent, selon l'invention, être administrés à des patients cancéreux afin de ralentir la progression de leurs tumeurs ou de faire régresser lesdites tumeurs.
- 15 Dans les méthodes ci-dessus, la protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire pourra en particulier être le polypeptide isolé codé par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par la séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 (autrement dit, la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10).
- 20 Enfin, l'invention concerne les polynucléotides de séquence SEQ. ID. NO. 4, SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 11 et SEQ. ID. NO. 12, lesquels peuvent notamment être utilisés en tant qu'amorce dans les réactions de PCR du clonage de l'hétérocarpine.

Les différents éléments évoqués ci-dessus deviendront évidents pour l'homme du métier une fois faite la lecture de la description plus détaillée des différents aspects de l'invention.

Description détaillée des différents aspects de l'invention

Comme mentionné ci-dessus, la présente invention est généralement dirigée vers des produits et des méthodes destinés à moduler la croissance cellulaire et à traiter le cancer. La présente invention est basée, en partie, sur l'identification de « séquences associées à la modulation de la prolifération cellulaire » qui sont des séquences polypeptidiques et polynucléotidiques associées à la modulation de la prolifération cellulaire. De telles molécules d'ADNc peuvent être préparées à partir de préparations d'ARN ou d'ARNm

en utilisant les techniques standard, comme la transcription inverse. De manière similaire, une protéine ou un polypeptide associé à la différenciation comprend la séquence codée par un ARNm associé à la différenciation cellulaire.

5 Les compositions pharmaceutiques décrites ici peuvent inclure un ou plusieurs polypeptides, séquences d'acides nucléiques et/ou anticorps. Les polypeptides de la présente invention comprennent au moins une portion de la protéine ou un variant de celle-ci fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire. Les séquences d'acides nucléiques de la présente invention comprennent une
10 séquence d'ADN ou d'ARN qui code au moins pour une portion d'un tel polypeptide ou qui est complémentaire à une telle séquence codante.

Les anticorps sont des protéines du système immunitaire ou des fragments de fixation à l'antigène de celui-ci, qui sont capables de fixer une portion des polypeptides décrits ci-dessus.

Polynucléotides, polypeptides et protéines selon l'invention :

15 La présente invention a en particulier pour objet les polynucléotides de séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ainsi que le polypeptide ou la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14.

L'invention comprend également les polynucléotides possédant des séquences polynucléotidiques homologues au moins à 75 %, de préférence au moins à 85 % et
20 encore plus préférentiellement au moins à 90 % voire 95 %, aux séquences des polynucléotides décrits plus haut, notamment aux séquences SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 et SEQ. ID. NO. 13. Cela s'applique également *mutatis mutandis* aux autres polynucléotides, polypeptides et protéines faisant partie de l'invention, et notamment à la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14.

25 Le degré d'homologie exprimé en % est calculé comme suit :

$$100 - 100 \times (N'/N)$$

avec N' représentant le nombre de nucléotides ou d'acides aminés modifiés par rapport à la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9, SEQ. ID. NO. 10, SEQ. ID. NO. 13 ou
30 SEQ. ID. NO. 14 et N le nombre de nucléotides de la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9, SEQ. ID. NO. 10, SEQ. ID. NO. 13 ou SEQ. ID. NO. 14.

Selon l'invention, les séquences polynucléotidiques qui codent pour les polypeptides ou protéines de l'invention, et des fragments ou des protéines de fusion de ces polypeptides

ou protéines, peuvent être utilisées pour générer des molécules d'ADN recombinant qui dirigent l'expression de ces polypeptides ou protéines, ou d'une portion active de ceux-ci, dans des cellules hôtes appropriées. Alternativement, des séquences polynucléotidiques qui s'hybrident avec des portions des séquences de polynucléotides selon l'invention peuvent également être utilisées dans des essais d'hybridation d'acides nucléiques, Southern blot, Northern blot, etc.

A cause de la dégénérescence du code génétique, d'autres séquences d'ADN codant substantiellement pour la séquence en acides aminés des polypeptides ou protéines de l'invention peuvent être utilisées pour le clonage et l'expression desdits polypeptides ou protéines. De telles séquences d'ADN incluent celles capables d'hybrider les séquences polynucléotidiques des polynucléotides de l'invention dans certaines conditions de stringence qui peuvent être ajustées de plusieurs manières. Par exemple, lors de réaction de polymérisation en chaîne (PCR), la température à laquelle s'hybrident les amorces à la matrice ou les concentrations de $MgCl_2$ dans le tampon réactionnel, peuvent être ajustés. Lors de l'utilisation de fragments d'ADN radio-marqués, ou d'oligonucléotides pour sonder des membranes, la stringence peut être ajustée en changeant les forces ioniques des solutions de lavage ou en contrôlant avec précaution la température de lavage.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue s'hybride spécifiquement avec la séquence complémentaire à la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 dans des conditions stringentes (ou des conditions de stringence « fortes »). Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, et d'après Sambrook et coll. (*Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989), T_m est définie par la relation :

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ G+C}) + 16,6 \times \log[\text{cations}] - 0,63 \times (\% \text{ formamide}) - (600 / \text{nombre de bases})$$

Pour la présente invention, les conditions de stringence seront dites « fortes » lorsque l'on utilise une température d'hybridation de 10°C en dessous de T_m et des tampons d'hybridation contenant une solution 6 x SSC (chlorure de sodium 0,9 M et citrate de sodium 0,09 M). Dans de telles conditions, les polynucléotides de séquences aspécifiques ne s'hybrideront pas avec le polynucléotide de la séquence complémentaire à la séquence SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13.

Des séquences d'ADN altérées qui peuvent être utilisées en accord avec la présente invention incluent des délétions, des additions ou des substitutions de différents résidus nucléotidiques résultant dans une séquence qui code le même produit du gène ou de fonction équivalente. Le produit du gène peut également contenir des délétions, des additions ou des substitutions de résidus d'acides aminés dans les séquences des protéines de l'invention, qui résultent dans des changements dits silencieux, produisant ainsi des polypeptides et protéines de fonction équivalente.

De telles substitutions en acides aminés peuvent être réalisés sur la base de la polarité, de la charge, de la solubilité, de l'hydrophobicité, de l'hydrophilicité, et/ou de la nature amphipatique des résidus impliqués.

Par exemple, des acides aminés chargés négativement incluent l'acide aspartique et l'acide glutamique, des acides aminés chargés positivement incluent la lysine et l'arginine, des acides aminés avec des groupements polaires ayant des valeurs d'hydrophobicité voisines incluent la leucine, l'isoleucine, la valine ; la glycine, l'alanine ; l'asparagine, la glutamine ; la sérine, la thréonine ; la phénylalanine, la tyrosine.

Les séquences d'ADN de la présente invention peuvent être modifiées pour altérer les séquences des polynucléotides selon l'invention pour de nombreuses raisons incluant de manière non limitative des altérations qui modifient le processus et l'expression du produit du gène. Par exemple, des mutations peuvent être introduites en utilisant des techniques bien connues de l'homme du métier, par exemple la mutagenèse dirigée, l'insertion de nouveaux sites de restriction, l'altération des glycosylations, la phosphorylation, etc.

En particulier, dans certains systèmes d'expression comme la levure, la cellule hôte peut sur-glycosyler le produit du gène. Dans un tel système, il est préférable d'altérer les séquences polynucléotidiques pour éliminer les sites de glycosylation. Dans l'étendue de la divulgation de la présente invention figurent également des séquences polynucléotidiques modifiées liées à des séquences hétérologues pour coder une protéine de fusion. La protéine de fusion (qui peut être par exemple la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14) peut être modifiée pour contenir un site de clivage localisé entre la séquence de la protéine selon l'invention (par exemple la séquence SEQ. ID. NO. 10) et la séquence de la protéine hétérologue, de telle sorte que la séquence de la protéine selon l'invention puisse être clivée de la partie hétérologue.

Polynucléotides codant pour des polypeptides associés à la modulation de la prolifération cellulaire :

Tout polynucléotide qui code pour un polypeptide ou une portion ou un variant de celui-ci comme décrit ici fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, est couvert par la présente invention. De tels polynucléotides peuvent être simple brin (codant ou anti-sens) ou double brin et peuvent être de l'ADN (génomique, ADNc ou synthétique) ou des molécules d'ARN.

Les polynucléotides codant pour des polypeptides fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire peuvent être préparés en utilisant n'importe quelle technique disponible pour l'homme du métier. Par exemple, un tel polynucléotide peut être amplifié *via* une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir d'ADNc préparé à partir de cellules. Pour cette approche, des amorces spécifiques peuvent être dessinées et commandées ou synthétisées ; ces amorces sont basées sur la séquence dudit polynucléotide. Une portion amplifiée peut ensuite être utilisée pour isoler le gène complet à partir d'une banque d'ADN génomique ou à partir d'une banque d'ADNc de n'importe quelle cellule ou n'importe quel tissu, grâce à des techniques bien connues de l'homme du métier et brièvement rappelées ci-dessous. Alternativement, un gène complet peut être construit à partir de plusieurs fragments de PCR. Les molécules d'ADNc codant pour une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ou une portion de celle-ci, peuvent également être préparées en criblant une banque d'ADNc obtenue par exemple à partir d'ARNm de cellules ou de tissus. De telles bibliothèques peuvent être disponibles dans le commerce ou peuvent être préparées en utilisant les techniques classiques (cf. Sambrook et coll., *Molecular cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Alternativement, d'autres techniques de criblage bien connues par l'homme du métier peuvent être employées.

Une molécule d'ADNc codant pour un polypeptide fixant le GHRH humain et étant associé à la modulation de la prolifération cellulaire peut être séquencée en utilisant les techniques classiques utilisant des enzymes comme le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, la Séquenase X (US Biochemical Corp., Cleveland, OH, Etats-Unis), la Taq polymérase (Perkin Elmer, Foster City, CA, Etats-Unis), la polymérase thermostable T7 (Amersham, Chicago, IL, Etats-Unis) ou une combinaison de polymérases recombinantes et d'exonucléases à activité de relecture comme le système d'amplification Elongase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, Etats-Unis). Un système de

séquençage automatique peut être utilisé à l'aide des instruments disponibles chez des fournisseurs commerciaux comme Perkin Elmer et Pharmacia.

La séquence partielle d'un ADNc peut être utilisée pour identifier une séquence polynucléotidique qui code pour la protéine complète associée à la modulation de la
5 prolifération cellulaire en utilisant des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. Parmi ces techniques, une librairie d'ADNc est criblée en utilisant une ou plusieurs sondes polynucléotidiques en utilisant les propriétés de recombinaison de RecA (ClonCapture cDNA Selection Kit, Clontech Laboratories, Etats-Unis).

Pour les techniques d'hybridation, une séquence partielle peut être radiomarquée (par
10 exemple par translation de coupure ou par marquage des extrémités en utilisant du ^{32}P ou du ^{33}P) en utilisant des techniques classiques. Une librairie de bactéries ou de bactériophages est ensuite criblée par hybridation sur des filtres contenant les colonies bactériennes dénaturées (ou les empreintes contenant les plaques de phages) avec la sonde marquée (cf. Sambrook et coll., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold
15 Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Les colonies positives ou plaques sont ensuite sélectionnées et amplifiées et l'ADN est isolé pour des analyses futures.

La séquence complète peut ensuite être déterminée en utilisant des techniques standard. Les séquences chevauchantes sont ensuite assemblées en une séquence unique continue.
20 Une molécule d'ADNc complète peut être générée par ligature des fragments d'intérêt en utilisant des techniques classiques.

Alternativement, il existe de nombreuses techniques basées sur l'amplification pour l'obtention d'une séquence codante complète à partir d'une séquence partielle d'ADNc. Parmi elles, l'amplification est généralement réalisée via PCR. L'ensemble des kits
25 disponibles dans le commerce peut être utilisé pour les étapes d'amplification. Les amorces peuvent être dessinées en utilisant, par exemple, des logiciels bien connus dans le métier. Les amorces nucléotidiques sont de préférence des molécules de 20 à 30 nucléotides ayant un contenu en guanine et cytosine d'au moins 50 % et qui s'hybrident avec la séquence cible à des températures comprises entre 50 et 72° C. La
30 région amplifiée peut être séquencée comme décrit ci-dessus et les séquences chevauchantes assemblées en une séquence continue.

Parmi les approches alternatives, des séquences adjacentes à la séquence partielle peuvent être retrouvées par amplification avec une amorce de la séquence de liaison et une amorce spécifique d'une région connue. Les séquences amplifiées sont ensuite
35 soumises à un second cycle d'amplification.

Des techniques additionnelles incluent la PCR de capture (Lagerstrom et coll., *PCR Methods Applic.* (1991), 1, 111-19) et la PCR progressive (Parker et coll., *Nucl. Acids. Res.* (1991), 19, 3055-60). D'autres méthodes utilisant l'amplification peuvent également être employées pour l'obtention d'une séquence complète d'ADNc.

5 Il est possible d'obtenir une séquence d'ADNc complète en analysant les séquences déposées dans les bases publiques « Expressed Sequence Tags » (ESTs) disponibles à partir de GenBank. Des recherches de recouvrement des ESTs peuvent être réalisées en utilisant des programmes informatiques bien connus de l'homme du métier (par exemple NCBI BLAST) et de tels ESTs peuvent être utilisés pour générer une séquence
10 complète continue.

Les variants des séquences polynucléotidiques décrites plus haut (notamment des séquences SEQ. ID. NO. 8, SEQ. ID. NO. 9 et SEQ. ID. NO. 13) sont également inclus dans le champ de la présente invention. Les variants polynucléotidiques peuvent contenir une ou plusieurs substitutions, délétions ou insertions (cf. aussi supra dans la
15 partie intitulée « Polynucléotides, polypeptides et protéines selon l'invention »).

Une portion de la séquence complémentaire de la séquence codante (i.e. un polynucléotide anti-sens) peut également être utilisée comme sonde ou comme modulateur de l'expression génique. Les construits d'ADNc pouvant être transcrits en ARN anti-sens peuvent être introduits dans des cellules ou dans des tissus pour faciliter
20 la production d'ARN anti-sens. Un polynucléotide anti-sens peut être utilisé, comme décrit ici, pour inhiber l'expression d'un gène associé à la modulation de la prolifération cellulaire. La technologie anti-sens peut être utilisée pour contrôler l'expression génique en formant une triple-hélice, qui compromet la capacité de la double hélice à s'ouvrir suffisamment pour la fixation des polymérases, des facteurs de transcription ou des
25 molécules de régulation (cf. Gee et coll. dans Huber et Carr, *Molecular and Immunologic Approaches* (1994), Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY). Alternativement, une molécule anti-sens peut être utilisée pour s'hybrider avec une région de contrôle du gène (par exemple un promoteur ou un site d'initiation de la transcription) et bloquer la transcription du gène, ou bloquer la traduction en inhibant la
30 fixation des ribosomes au transcrit.

Les polynucléotides peuvent ensuite être modifiés pour augmenter leur stabilité *in vivo*. Des modifications possibles incluent (mais ne sont pas limitées à) : l'addition de séquences aux extrémités 5' et/ou 3' ; l'utilisation de phosphorothioate ou de 2' O-méthyle plutôt que des liaisons phosphodiesterase dans le squelette ; et/ou
35 l'introduction de bases comme l'inosine, la quéosine et la wybutosine de même que

l'acétyladénine, la méthylthioadénine et d'autres formes modifiées de l'adénine, la cytidine, la guanine, la thymine et l'uridine.

D'autres variations des polynucléotides de la présente invention ont par ailleurs déjà été décrites précédemment dans la partie intitulée « Polynucléotides, polypeptides et protéines selon l'invention ».

Les séquences de nucléotides comme décrites dans la présente invention peuvent être jointes à d'autres séquences nucléotidiques en utilisant des techniques établies d'ADN recombinant. Par exemple, un polynucléotide peut être cloné dans un large panel de vecteurs d'expression, incluant des plasmides, des phagemides, des dérivés du phage lambda et des cosmides. Les vecteurs d'intérêt particulier incluent les vecteurs d'expression, des vecteurs de répllication et des vecteurs de séquençage. En général, un vecteur contient une origine de répllication fonctionnelle dans au moins un organisme, des sites de restriction endonucléasiques convenables et un ou plusieurs marqueurs de sélection. La présence d'autres éléments dépendra de l'utilisation spécifique souhaitée par l'homme du métier qui sélectionnera les caractéristiques du vecteur d'expression en fonction de ses besoins et des techniques disponibles.

Les polynucléotides peuvent être formulés pour entrer dans la cellule et exprimer le polypeptide correspondant. De telles formulations sont particulièrement utiles en thérapeutique comme décrit ci-après.

Les hommes du métier apprécieront qu'il existe plusieurs moyens pour exprimer un polynucléotide dans une cellule cible, et que n'importe quelle technique adéquate peut être employée. Par exemple, un polynucléotide peut être incorporé dans un vecteur viral comme un adénovirus ou un rétrovirus (mais aussi dans d'autres). Des techniques pour incorporer de l'ADN dans de tels vecteurs sont bien connues de l'homme de l'art. Un vecteur rétroviral peut transférer ou incorporer un gène pour un marqueur de sélection et/ou une entité de ciblage comme un gène codant pour le ligand d'un récepteur spécifique d'une cellule cible, afin de rendre le vecteur cible-spécifique.

D'autres formulations pour les polynucléotides incluent les systèmes de dispersion colloïdaux comme des complexes macromoléculaires, nano-capsules, microsphères, billes, et des systèmes basés sur l'utilisation des lipides incluant les émulsions huile/eau, micelles, micelles mixtes et liposomes. Le système colloïdal préféré pour une utilisation de délivrance du produit *in vitro* et *in vivo* est le liposome (i.e. une vésicule membranaire artificielle).

Polypeptides fixant le GHRH humain et modulant la prolifération cellulaire :

Dans l'étendue de la divulgation, les polypeptides de la présente invention comprennent au moins une portion de la protéine associée à la modulation de la prolifération cellulaire ou d'un variant de celle-ci, ladite portion étant immunologiquement et/ou biologiquement active. De tels polypeptides peuvent avoir n'importe quelle longueur, incluant la protéine complète, un oligopeptide (i.e. consistant en un nombre relativement limité d'acides aminés, comme 8-10 résidus, joints par des liaisons peptidiques) ou un peptide de taille intermédiaire. Un polypeptide peut également comprendre des séquences additionnelles.

De manière similaire, un polypeptide est « biologiquement actif » s'il possède une ou plusieurs fonctions structurales, régulatrices et/ou biochimiques à partir de la protéine native associée à la fixation du GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire.

La présence d'une activité biologique peut être déterminée selon des méthodes bien connues de l'homme du métier. Toutefois, par définition dans le cadre de la présente invention, un polypeptide sera considéré comme « ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire » dès lors que sa concentration inhibitrice CI_{50} mesurée dans les conditions décrites dans l'exemple 6 de la présente demande sera inférieure ou égale à 10 nM (et de préférence inférieure ou égale à 1 nM).

Par exemple, des études de comparaison de séquences peuvent indiquer une activité biologique particulière de la protéine. Les essais tendant à évaluer ladite activité peuvent alors être mis en œuvre sur la base d'essais déjà connus dans le métier. Certaines portions et d'autres variants de telles protéines devraient également montrer cette propriété selon un test *in vitro* ou *in vivo*.

Comme déjà mentionné, les polypeptides selon la présente invention peuvent comprendre une ou plusieurs portions d'un variant de la protéine endogène où la portion est immunologiquement et/ou biologiquement active (i.e. la portion présente une ou plusieurs caractéristiques antigéniques, immunogéniques et/ou biologique de la protéine complète). De préférence, une telle portion est au moins aussi active que la protéine totale lors d'essais permettant la détection de telles propriétés. Un polypeptide « variant » est un polypeptide qui diffère de la protéine native par des substitutions, des insertions, des délétions et/ou des modifications en acides aminés. Certains variants

contiennent des substitutions conservatrices. « Une substitution conservatrice » est une substitution dans laquelle un acide aminé est substitué par un autre acide aminé ayant les mêmes propriétés, comme celles déterminées par l'homme du métier qui n'attend aucun changement dans la structure secondaire, ainsi que dans la nature hydrophatique du polypeptide. Les substitutions d'acide aminé peuvent généralement être réalisées sur la base de similarité de polarité, de charge, de solubilité, d'hydrophobicité, d'hydrophilicité, et/ou de la nature amphipathique des résidus. Par exemple, des acides aminés chargés négativement incluent l'acide aspartique et l'acide glutamique ; des acides aminés chargés positivement incluent la lysine et l'arginine ; et des acides aminés non chargés polaires ayant des valeurs d'hydrophobicité similaire incluent la leucine, l'isoleucine et la valine ; la glycine et l'alanine ; l'asparagine et la glutamine ; la sérine, la thréonine, la phénylalanine et la tyrosine. D'autres groupes d'acides aminés qui peuvent représenter des changements conservateurs sont notamment les suivants : (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr ; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe ; (4) Lys, Arg, His ; et (5) Phe, Tyr, Trp, His. Un variant peut également, ou alternativement, contenir des changements non conservateurs.

Des variants faisant partie de cette invention incluent également des polypeptides dans lesquels la structure primaire de la protéine native est modifiée par formation de conjugués covalents ou pas avec d'autres polypeptides ou des structures chimiques comme des groupes lipidiques ou des groupes glycosyle, ou phosphate acétyle.

La présente invention inclut également des polypeptides avec ou sans motifs de glycosylation. Les polypeptides exprimés dans des systèmes d'expression de levure ou de cellules de mammifères peuvent être, en termes de poids moléculaire et de schéma de glycosylation, similaires à ou légèrement différents de la molécule native selon le système d'expression utilisé.

L'expression d'ADN chez la bactérie comme *E. Coli* conduit à des molécules non-glycosylées. Les sites de N-glycosylation des protéines eucaryotes sont caractérisés par le triplet d'acides aminés Asn-A1-Z où A1 est n'importe quel acide aminé excepté Pro, et Z est une sérine ou une thréonine.

D'autres variations des polypeptides et protéines de la présente invention ont par ailleurs déjà été décrites précédemment dans la partie intitulée « Polypeptides et polynucléotides selon l'invention ».

Pour préparer un variant polypeptidique, des techniques standard de mutagenèse, comme la mutagenèse dirigée en utilisant un oligonucléotide dirigé, peuvent être utilisées.

En général, n'importe quel vecteur d'expression connu de l'homme du métier peut être employé pour exprimer des polypeptides recombinants de cette invention. L'expression peut être obtenue dans n'importe quelle cellule hôte appropriée qui a été transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN qui code pour le polypeptide recombinant. Des cellules hôtes convenables incluent des cellules procaryotes, d'eucaryotes supérieurs ou de levure. De préférence, les cellules hôtes employées sont *E. Coli*, des cellules de levure ou des cellules de mammifères comme COS, CHO, HEK-293, MCF7 (cellules tumorales humaines isolées à partir d'un carcinome mammaire) ou DU 145 (cellules tumorales humaines isolées à partir d'un cancer de la prostate).

Certaines portions et d'autres variants peuvent également être générés par des moyens synthétiques en utilisant des techniques bien connues de l'homme de l'art. Par exemple, des portions et autres variants ayant moins de 500 acides aminés, de préférence moins de 100 acides aminés et plus préférentiellement moins de 50 acides aminés peuvent être synthétisés par voie chimique. Les polypeptides peuvent être synthétisés en utilisant des techniques de synthèse sur phase solide disponibles commercialement, comme la méthode de synthèse sur résine de Merrifield où les acides aminés sont séquentiellement ajoutés à une chaîne d'acides aminés en cours de synthèse (cf. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* (1963), 85, 2149-2146). De nombreuses autres techniques de synthèse sur phase solide sont également disponibles (par exemple la méthode de Roberge et coll., *Science* (1995), 269, 202-204). Des équipements pour la synthèse automatique de polypeptides sont commercialement disponibles chez des fournisseurs comme Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA, Etats-Unis) ; la synthèse des polypeptides peut alors être réalisée en suivant les recommandations du constructeur.

Polynucléotides ou polypeptides isolés :

En général, les polypeptides et polynucléotides décrits dans la présente invention sont isolés. Un polypeptide ou un polynucléotide « isolé » est un polynucléotide ou un peptide enlevé de son environnement original. Par exemple, une protéine naturelle est isolée si elle est séparée du matériel biologique avec lequel elle coexiste dans le système naturel. Un polynucléotide est considéré comme isolé si, par exemple, il est cloné dans un vecteur qui ne fait pas partie de l'environnement naturel.

Anticorps et fragments de ceux-ci :

La présente invention fournit des agents de fixation, comme les anticorps qui fixent spécifiquement la protéine associée à la fixation du GHRH humain et étant associée à la

modulation de la prolifération cellulaire. Un tel agent est dit comme « fixant spécifiquement » à la protéine de modulation de la prolifération cellulaire s'il réagit à un niveau détectable (par exemple par un essai ELISA) avec une protéine associée à la modulation de la prolifération cellulaire ou une portion ou un variant de celle-ci et ne réagit pas de manière détectable avec d'autres protéines. « La fixation » se réfère à une association non covalente entre 2 molécules séparées de telle sorte qu'un complexe se forme. La capacité à la fixation peut être évaluée, par exemple, par la détermination de la constante de fixation pour la formation du complexe. La constante de fixation est la valeur obtenue lorsque la valeur de la concentration du complexe est divisée par le produit des valeurs des concentration des composants. En général, 2 produits sont dits « fixés » lorsque la constante de fixation atteint 10^3 l/mol. La constante de fixation peut être déterminée en utilisant des méthodes bien connues de l'homme du métier.

N'importe quel agent capable de répondre aux critères ci-dessus peut être considéré comme un agent fixant.

Dans la présente invention, un agent de fixation est de préférence un anticorps ou un fragment de celui-ci. Les anticorps peuvent être préparés par n'importe quelle technique disponible à l'homme du métier (cf. Harlow et Lane, *Antibodies. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En général, les anticorps peuvent être produits par des techniques de culture cellulaire incluant la génération d'anticorps monoclonaux ou *via* des transfections de gènes d'anticorps dans des cellules hôtes de bactéries ou de mammifères afin de produire des anticorps recombinants.

Parmi d'autres techniques, on préférera employer celles décrites ci-après. Un immunogène contenant le polypeptide est injecté chez un groupe de mammifères (par exemple souris, rats, lapins, moutons ou chèvres). Dans cette étape, les polypeptides de la présente invention peuvent servir d'immunogènes sans modification. Alternativement, et particulièrement pour des peptides de petite taille, une réponse immunitaire supérieure peut être induite si le polypeptide est joint à une protéine de transport comme l'albumine de sérum bovin ou l'hémocyanine de patelle. L'immunogène est injecté chez l'animal hôte, de préférence selon un schéma prédéterminé, et les animaux sont saignés périodiquement. Des anticorps polyclonaux spécifiques du polypeptide peuvent ainsi être purifiés à partir de tels antisérums, par exemple par chromatographie d'affinité en utilisant le peptide couplé à un support solide adéquat.

Pour préparer un anticorps fixant spécifiquement une protéine de séquence A mais pas une protéine de séquence B, la protéine de séquence A est injectée chez l'animal hôte,

- de préférence selon un schéma prédéterminé, et les animaux sont saignés périodiquement. Des anticorps polyclonaux spécifiques du polypeptide de séquence A peuvent ainsi être purifiés à partir de tels antisérums, par exemple par chromatographie d'affinité en utilisant la protéine de séquence B couplée à un support solide adéquat.
- 5 L'éluat correspondant contient l'anticorps fixant spécifiquement une protéine de séquence A mais pas une protéine de séquence B.

Protéines de fusion :

- N'importe quel gène de fusion peut être réalisé par l'homme du métier pour analyser la localisation sub-cellulaire d'une protéine selon l'invention, en particulier la localisation
- 10 sub-cellulaire de la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10. De nombreuses constructions plasmidiques sont disponibles commercialement comme la protéine Glutathione S Transférase (GST) ou des protéines fluorescentes comme la Green Fluorescent Protein (GFP) ou encore et de manière non exhaustive un marquage poly-Histidine.
- 15 Des cellules hôtes eucaryotes humaines (par exemple HEK-293) sont sous-cultivées durant 24 h avant le protocole de transfection permettant un métabolisme normal des cellules et une meilleure efficacité de transfection. Des concentrations croissantes (1, 5 et 10 µg) de vecteur seul contenant la protéine révélatrice (GFP, GST ou Tag Histidine) ou de vecteur contenant le polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 8 ou le
- 20 polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 9 fusionnée avec la protéine révélatrice ont été réalisées en utilisant le réactif Effectene[®] selon les recommandations du fabricant (Qiagen).

- Les cellules sont ensuite analysées par microscopie confocale, par exemple, pour détecter la localisation de la protéine. Si la protéine est suspectée d'être sécrétée par
- 25 exemple, les surnageants sont récupérés, lyophilisés, déposés sur gel d'acrylamide et analysés par la technique de Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine révélatrice.

Compositions pharmaceutiques :

- Selon certains aspects de l'invention, des produits tels que des polypeptides, anticorps
- 30 et/ou acides nucléiques peuvent être incorporés dans des compositions pharmaceutiques ou des vaccins. Les compositions pharmaceutiques comprennent un ou plusieurs de ces produits et un ou des excipients (transporteurs) pharmaceutiquement acceptables. Certaines compositions pharmaceutiques éventuellement utilisables comme vaccins

pourront comprendre un ou plusieurs polypeptides et un activateur de la réponse immunitaire, comme un adjuvant ou un liposome (dans lequel le produit est incorporé). Les compositions pharmaceutiques et les vaccins peuvent de plus contenir un système d'administration, comme des microsphères biodégradables (et par exemple les
5 microsphères composées de copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique ou PLGA). Les compositions pharmaceutiques et les vaccins dans l'étendue de la divulgation de la présente invention peuvent également contenir d'autres produits pouvant être biologiquement actifs ou inactifs.

Une composition pharmaceutique ou un vaccin peut contenir de l'ADN codant pour un
10 ou plusieurs polypeptides comme décrit ci-dessus, de telle sorte que le polypeptide est généré *in situ*. Comme mentionné précédemment, l'ADN peut être présent sous n'importe quelle forme d'administration connue de l'homme du métier, y compris des systèmes d'expression d'acides nucléiques, bactériens ou viraux. Les systèmes d'expression d'acides nucléiques appropriés contiennent les séquences d'ADN
15 nécessaires pour l'expression chez le patient.

Les systèmes d'administration basés sur une bactérie impliquent l'administration de *bacterium* (comme Bacillus-Calmette-Guerrin) qui exprime une portion immunogène du polypeptide à sa surface. De préférence, l'ADN peut être introduit en utilisant un système d'expression viral (par exemple un pox virus, un rétrovirus ou un adénovirus)
20 impliquant l'utilisation d'agents non pathogènes (défectif).

Bien que tout transporteur adéquat connu de l'homme du métier puisse être employé dans des compositions pharmaceutiques de cette invention, le type de transporteur variera selon le mode d'administration choisi. Les compositions de la présente invention pourront être formulées pour chaque mode d'administration approprié, y compris, par
25 exemple, les voies topique, nasale, intraveineuse, intra-craniale, intra-péritonéale, sous-cutanée et intramusculaire.

Pour une administration parentérale, comme une injection sous-cutanée, le transporteur contient de préférence de l'eau, du sel, de l'alcool, de la graisse, de la paraffine ou un tampon. Pour une administration orale, tout transporteur cité ci-dessus ou un
30 transporteur solide, comme du mannitol, du lactose, de l'amidon, du stéarate de magnésium, du talc, de la cellulose, du glucose, du sucrose et du carbonate de magnésium peut être employé. Des microsphères biodégradables peuvent aussi être utilisées comme transporteurs pour les compositions pharmaceutiques de cette invention. Pour certaines applications topiques, des formulations comme des crèmes ou
35 des lotions sont préférées.

De telles compositions peuvent également comprendre des tampons (par exemple des solutions salines tamponnées neutres ou phosphate), des carbohydrates (par exemple du glucose, du mannose, du sucrose ou des dextrans), du mannitol, des protéines, des polypeptides ou des acides aminés comme la glycine, des antioxydants, des agents chélateurs comme l'EDTA ou la glutathione, des adjuvants (par exemple de l'hydroxyde d'aluminium) et/ou des agents protecteurs. Alternativement, les compositions de la présente invention peuvent se présenter sous forme d'un lyophilisat. Des produits peuvent également être encapsulés dans des liposomes en utilisant des technologies classiques.

- 10 Selon l'invention, chacune des variétés d'adjuvants peut être utilisée dans des vaccins pour induire la réponse immunitaire. La plupart des adjuvants contient une substance protégeant l'antigène d'un catabolisme rapide, comme l'hydroxyde d'aluminium ou l'huile minérale et un stimulateur des réponses immunitaires comme le lipide A, des protéines dérivées de Bordetella Pertussis ou Mycobacterium tuberculosis. Des adjuvants
- 15 adéquats sont commercialement disponibles comme, par exemple : l'adjuvant de Freund et l'adjuvant complet (Difco Laboratories, Detroit, MIY, Etats-Unis ; Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ, Etats-Unis)), des microsphères biodégradables ; le lipide A monophosphoryle ; et des cytokines comme le GM-CSF ou l'interleukine-2, -7 ou -12.
- 20 Les compositions décrites ci-dessus peuvent également être administrées sous forme de formulations retard (i.e. une formulation comme une capsule ou une éponge qui déclenche la libération lente du produit après administration). De telles formulations peuvent généralement être préparées en utilisant des technologies bien connues de l'homme du métier et administrées, par exemple, par voie orale, rectale ou en
- 25 implantation sous-cutanée ou par implantation sur le site cible désiré. Les formulations retard peuvent contenir un polypeptide, un polynucléotide ou un anticorps dispersé dans une matrice transporteuse et/ou contenu dans un réservoir protégé par une membrane de diffusion. Les transporteurs pour l'utilisation de telles formulations sont biocompatibles et doivent également être biodégradables ; de préférence la formulation fournit un
- 30 niveau relativement constant de la libération du composant actif. La quantité de produit actif contenue dans la formulation retard dépend du site d'implantation.

Thérapie anticancéreuse :

- Selon d'autres aspects de la présente invention, les produits décrits peuvent être utilisés en thérapie anticancéreuse. En particulier, les polynucléotides et polypeptides associés à
- 35 la fixation du GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération

cellulaire peuvent être utilisés pour inhiber la croissance et induire une modulation de la prolifération cellulaire dans des tumeurs spécifiques du sein, de la prostate ou du cancer du poumon.

5 De tels polypeptides ou polynucléotides peuvent également être utilisés pour la thérapie de nombreux carcinomes incluant les mélanomes, les formes multiples de glioblastomes, les carcinomes du poumon ainsi que les cancers colorectaux. Des agents qui activent l'expression de tels polypeptides ou polynucléotides peuvent également être employés dans le cadre de ces thérapies.

10 Selon ces aspects de l'invention, les produits (pouvant être des polypeptides ou des acides nucléiques) sont de préférence incorporés dans des compositions pharmaceutiques comme décrit ci-dessus.

15 Les patients adéquats pour la thérapie sont tous les animaux à sang chaud, et de préférence l'être humain. Un patient éligible pour une thérapie selon l'invention peut ou non être diagnostiqué comme étant affecté par un cancer. Autrement dit, les compositions pharmaceutiques décrites ci-dessus peuvent ainsi être utilisées pour inhiber le développement d'un cancer à différents stades de la maladie (pour prévenir l'apparition d'un cancer ou pour traiter un patient affecté par un cancer).

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention seront administrées de manière appropriée pour chaque cancer spécifique à traiter.

20 La voie, la durée et la fréquence d'administration seront déterminées en fonction de l'état du patient, du type et de la sévérité de la maladie, et de la méthode d'administration. Les voies et fréquences d'administration peuvent varier d'un individu à l'autre. En général, les compositions pharmaceutiques et les vaccins peuvent être administrés par injection (par exemple par la voie intra-cutanée, intramusculaire, 25 intraveineuse ou sous-cutanée), par voie intra-nasale (par exemple par inhalation) ou par voie orale. De préférence, entre 1 et 10 doses peuvent être administrées sur une période de 52 semaines. Des protocoles alternatifs peuvent être appropriés pour chaque patient individuellement.

30 En général, un dosage approprié et un régime de traitement contiennent le produit actif en quantité suffisante pour fournir un bénéfice thérapeutique et/ou prophylactique. Une telle réponse peut être suivie par l'établissement d'un devenir clinique amélioré (par exemple des rémissions plus fréquentes, une survie en absence de la maladie complète, partielle ou plus longue) chez les patients traités comparés aux patients non traités ou traités par des doses moindres.

- Selon d'autres aspects de la présente invention, un polypeptide peut être administré à des doses variant de 100 µg à 5 mg. Les molécules d'ADN codant pour de tels polypeptides peuvent généralement être administrées en quantité suffisante pour générer des niveaux comparables de polypeptides. Des dosages appropriés peuvent généralement être déterminés en utilisant des modèles expérimentaux et/ou des essais cliniques. En général, l'utilisation de la dose minimum suffisante pour fournir une thérapie efficace est préférée. Les patients peuvent généralement être suivis en ce qui concerne l'efficacité de la thérapie en utilisant des essais adéquats pour les conditions de traitement ou de prévention qui apparaîtront familiers à l'homme du métier.
- 10 A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevets, tous les brevets et toutes autres références mentionnées ici sont incorporées par référence.
- 15 Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : clonage de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine

1.1) Extraction des ARNs à partir des cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* :

- 20 Les cellules en culture sont conservés à -80 C avant les étapes d'extraction des ARNs totaux. L'extraction des ARNs totaux est basée sur une technique décrite dans la littérature scientifique (Chomczynski et Sacchi, *Anal. Biochem.* (1987), 162, 156) à l'aide du réactif Trizol (Gibco/BRL). La qualité des ARNs ainsi extraits est analysée sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium.

25 1.2) Synthèse des ADNc par transcription inverse :

Les ARNs sont rétro-transcrits selon deux modes opératoires différents afin de dissocier et de favoriser les transcriptions inverses des parties 5' et 3' des ARNs à l'aide du kit SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

1.3) Design et synthèse des amorces pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

L'amplification des 2 séquences spécifiques de l'ADNc de l'hétérocarpine a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur les produits de la transcription inverse en utilisant l'amorce Rev1 pour les produits d'ADNc spécifiques 5' et l'amorce Fwd1 pour les produits d'ADNc spécifiques 3' de séquences respectives SEQ. ID. NO. 4 et SEQ. ID. NO. 5.

Les séquences SEQ. ID. NO. 4 et SEQ. ID. NO. 5 sont les suivantes :

- SEQ. ID. NO. 4 :

5'-TCC AAG CAG CAA AAA CTA GTG ACC CAG GGG CCA TTA TAT CT-3'

- SEQ. ID. NO. 5 :

5'-CGG TAT GGA CGC GGC TAT TGC TGA TGG TGT TGA TGT AA-3'

1.4) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et résultats :

Les conditions de réaction incluent 0,2 μ M de Fwd1 pour les produits d'ADNc spécifiques 3' et 0,2 μ M de Rev1 pour les produits d'ADNc spécifiques 5', 200 μ M dNTPs, 40 mM Tricine-KOH (pH 8,7), 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 μ g/ml BSA, 0,005% Tween-20, 0,005% Nonidet-P40, et 0,5 U Taq ADN polymérase dans un volume final de 50 μ l. Les réactions de PCR sont réalisées sur un thermocycleur Perkin-Elmer 9700 en utilisant les paramètres de cycles thermiques suivants : 5 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 72 °C, 5 cycles comprenant une dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 70° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant 3 minutes et enfin 25 cycles comprenant une dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 68° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant 3 minutes.

Les produits obtenus par la PCR sont séparés sur gel d'agarose 1 % et visualisés à l'aide d'une coloration au bromure d'éthidium.

Les séquences en acides nucléiques des produits de PCR d'ADNc spécifiques 5' et spécifiques 3' sont déterminées à l'aide d'un séquenceur automatique. Il s'agit respectivement des séquences SEQ. ID. NO. 6 et SEQ. ID. NO. 7 reproduites ci-après :

- SEQ. ID. NO. 6 :

1 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggatgcccc

61 aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttggtgtt ttgtcaaagc agcaatgagg
121 tctaggaatg gtgttcttca tttattcctt ttcgttcttg catggcttct gttggcggct
181 ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaagacc
241 catatgccca aaaccttctc tagcccccac cattgggtact cttcggtcgt tcgatccctc
5 301 aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgatcct caccacttct tgtatactct
361 tacgacaatg ctgctcatgg tttcagtgcg gttttatctc aacaggaact tgaaactcta
421 aaaaagtctc cagggttctg ctcagtttat gccgataaga cagcgacact tgacaccacc
481 catacacctg aatttctctc cctgaatact gccaacgggt tgtggcctgc ttcaaagtat
541 ggtgaagata taattggttg tgttattgac agcgggtgtct ggccggagag tgaaagttat
10 601 aatgatgatg gtatgggctc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggacaa
661 gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatattt cgataagggg
721 atcattgctg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgggg
781 catgggactc acacatcctc cacagttgct ggaattatg tggatggcgt ttcattcttt
841 ggctatgcta aagggtacagc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtacaag
15 901 gtcattttttg acgaagggcg ctatgcatct gatgttcttg ccggtatgga cgcggtattt
961 gctgatgggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatgaa
1021 gatcctatag caattgcctc attcgtctgt acagagaagg gcgtagtggg ctcatcttca
1081 gcaggaaatg cagggccagc gctagggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaact
1141 gttgcagctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gagtggggaa
20 1201 accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgctt
1261 tataacaaga cttactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactgac
1321 gccatcatcg tatgcgaaga agctgaagat tcggtatctg agcaaataac tgttgtcagt
1381 gcatcgaaca ttcggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaactt
1441 ggtggtgtga ctattcctgg tgtcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatcagc
25 1501 tacgccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgggg
1561 acaaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatcca
1621 ggcattctaa agccagatat aatggccctt gggtcactag tttttgctgc ttgga

- SEQ. ID. NO. 7 :

1 cggatatggac gcggtatttg ctgatggtgt tgatgtaatt tcaatatcaa tgggatttga
61 tgagaccccg ttgtatgaag atcctatagc aattgcctca ttcgctgcta cagagaaggg
121 cgtagtggtc tcatcttcag caggaaatgc agggccagcg ctagggagct tgcacaatgg
181 aatcccatgg acgttaactg ttgcagctgg aaccattgac cgttcatttg caggcactat
5 241 aactcttggg agtggggaaa ccatcattgg atggacaatg ttcccagcca gtgcttatgt
301 agcagacttg ccaactgcttt ataacaagac ttactctgca tgcaactcaa ctcgattatt
361 atctcaactc cgaactgacg ccatcatcgt atgcgaagaa gctgaagatt cggtatctga
421 gcaaatatct gttgtcagtg catcgaacat tcggggagcc atatttgttt cagattatga
481 tgctgaatta tttgaacttg gtggtgtgac tattcctggg gtcgtgatta gcaccaagga
10 541 tgcaccggct gtgatcagct acgccagcaa tgatgtgaaa cctaaggcaa gcatcaagtt
601 ccaacaaact gttctgggca caaagcctgc accagccgtg gctttctata cttctagagg
661 tccgtcaccg agctatccag gcatcttaaa gccagatata atggcccctg ggtcactagt
721 ttttgctgct tggattccaa atactgctac agcccaaatt ggtttgaata ccctcttgac
781 aagtgaatac aatatggttt ctggaacatc aatggcctgc cctcatgctg ctggtgtagc
15 841 tgctctcctt aagggcgcac accctgaatg gagtgcagct gctattaggt ctgcaatgat
901 gactacagca aatcccttgg ataacacact aatccaatc cgggacaatg gtctaataca
961 tttcacatct gcttcacctt tagctatggg agccggccaa gttgatccta atcgggcact
1021 tgatcctggg ttgatttatg aaaccacccc acaagattat gtgagcctcc tctgcactct
1081 gaacttcacc caaaaccaa tctgtccat tacaagatca aaccgttaca gctgctccac
20 1141 ccctaatact gatcttaact atccttcttt tattacttta cactacaaca caaatgcaac
1201 atttgttcag acttttcaca ggactgtgac taacgttgga ggaagcgcta caacttaca
1261 ggccaagatc actgctcctc taggttctgt agttagtgtc tcaccagaca cattggcctt
1321 cagaaagcag tatgagcagc agagctacga gtcactatt gagtacaagc ctgatggtga
1381 agaaactgtt tcatttgggg aacttgtttg gattgaagaa aatgggaatc acactgtgag
25 1441 gagccctatt acagtgtcac cttccatgag taactttgtg tttatgggta cacaataatt
1501 gataaaaatt tgttctgatc acaactgtgg gaataatcga cgtttatgaa ccagaataa
1561 gttgtttggg cgtcttcaac attatcataa aggacttgaa tcatgtgtgt tgattttctg
1621 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagtactctg cgttgatacc actgcttgcc ctatagttag
1681 tcgtattag

Les séquences chevauchantes SEQ. ID. NO. 6 et SEQ. ID. NO. 7 permettent de déduire la séquence complète de l'ADNc de séquence SEQ. ID. NO. 8 codant pour l'hétérocarpine. La séquence SEQ. ID. NO. 8 est reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 8 :

```

5      1 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggatgcccc
      61 aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttggtgtt ttgtcaaagc agcaatgagg
      121 tctaggaatg gtgttcttca tttattcctt ttcgttcttg catggcttct gttggcggct
      181 ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaagacc
      241 catatgcccc aaaccttctc tagccccac cattgggtact cttcggtcgt tcgatccctc
10     301 aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgatcct caccacttct tgtatactct
      361 tacgacaatg ctgctcatgg tttcagtgc gttttatctc aacaggaact tgaaactcta
      421 aaaaagtctc caggtttcgt ctcagtttat gccgataaga cagcgacact tgacaccacc
      481 catacacctg aatttctctc cctgaatact gccaacgggt tgtggcctgc ttcaaagtat
      541 ggtgaagata taattggttg tgttattgac agcgggtgtct ggccggagag tgaaagttat
15     601 aatgatgatg gtatgggagc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggacaa
      661 gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatatatt cgataagggg
      721 atcattgcgg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgggg
      781 catgggactc acacatcctc cacagttgct gggaattatg tggatggcgt ttcattcttt
      841 ggctatgcta aaggtacagc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtacaag
20     901 gtcatttttg acgaagggcg ctatgcatct gatgttcttg ccggtatgga cgcggtctatt
      961 gctgatggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatgaa
      1021 gatcctatag caattgcctc attcgctgct acagagaagg gcgtagtggg ctcatcttca
      1081 gcaggaaatg cagggccagc gctagggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaact
      1141 gttgcagctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gagtggggaa
25     1201 accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgctt
      1261 tataacaaga ctactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactgac
      1321 gccatcatcg tatgcgaaga agctgaagat tcggtatctg agcaaataac tgttggtcagt
      1381 gcaticgaaca ttcggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaactt

```

1441 ggtggtgtga ctattcctgg tgtcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatcagc
 1501 tacgccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgggc
 1561 acaaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatcca
 1621 ggcatcttaa agccagatat aatggcccct gggtcactag tttttgctgc ttggattcca
 5 1681 aatactgcta cagcccaa at tggtttgaat accctcttga caagtgaata, caatatgggtt
 1741 tctggaacat caatggcctg ccctcatgct gctgggtgtag ctgctctcct taagggcgca
 1801 caccctgaat ggagtgcagc tgctattagg tctgcaatga tgactacagc aaatcccttg
 1861 gataacacac taaatccaat ccgggacaat ggtctaata atttcacatc tgcttcacct
 1921 ttagctatgg gagccggcca agttgatcct aatcgggcac ttgatcctgg tttgatttat
 10 1981 gaaaccaccc cacaagatta tgtgagcctc ctctgactc tgaacttcac ccaaaaccaa
 2041 atcctgtcca ttacaagatc aaaccgttac agctgctcca cccctaatac tgatcttaac
 2101 tacccttctt ttattacttt aactacaac acaaatgcaa catttggtca gacttttcac
 2161 aggactgtga ctaacgttgg aggaagcgt acaacttaca aggccaagat cactgctcct
 2221 ctaggttctg tagttagtgt ctcaccagac acattggcct tcagaaagca gtaggagcag
 15 2281 cagagctacg agctcactat tgagtacaag cctgatgggtg aagaaactgt ttcatttggg
 2341 gaacttgttt ggattgaaga aaatgggaat cacactgtga ggagccctat tacagtgtca
 2401 ccttccatga gtaactttgt gtttatgggt acacaataat tgataaaaat ttgttctgat
 2461 cacaactgtg ggaataatcg acgtttatga accagaata agttgtttgg tcgtcttcaa
 2521 cattatcata aaggacttga atcatgtgtg ttgattttct gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
 20 2581 aaagtactct gcgttgatac cactgcttgc cctatagtga gtcgtattag

Dans la séquence SEQ. ID. NO. 8, l'on observe une phase ouverte de lecture avec la présence d'un codon initiateur (ATG) codant pour une méthionine initiatrice en position 115 et d'un codon stop (UAA) en position 2437. Le polynucléotide contenant la séquence codant pour l'hétérocarpine correspond à la séquence SEQ. ID. NO. 9, reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 9 :

1 atgaggtcta ggaatgggtg tcttcattta ttccttttcg ttcttgcatg gcttctgttg
 61 gcggctctcc atgctaactc aagttcggat gagagatcaa catatatagt tcatatggac

121 aagacccata tgcccaaaac cttctctagc cccaccatt ggtactcttc ggtcgttcga
181 tccctcaagt ctacaaagcc aaccaaatta aatcgccgtc gatcctcacc acttcttgta
241 tactcttacg acaatgctgc tcatggtttc agtgcagttt tatctcaaca ggaacttgaa
301 actctaaaaa agtctccagg ttctgtctca gtttatgccg ataagacagc gacacttgac
5 361 accacccata cacctgaatt tctctccctg aatactgcca acgggttggtg gcctgcttca
421 aagtatggtg aagatataat tgttggtggtt attgacagcg gtgtctggcc ggagagttaa
481 agttataatg atgatggtat gggcgctatt ccaagcagat ggaagggaga atgtgaagct
541 ggacaagagt tcaattcctc catgtgcaac tcaaagctta ttggagctag atatttcgat
601 aagggatatca ttgcggcaaa tcctgggatt aacattagca tgaaatctgc cagagatact
10 661 atggggcatg ggactcacac atcctccaca gttgctggga attatgtgga tggcgtttca
721 ttctttggct atgctaaagg tacagcaaaa ggagtggcac cacgggagag agtggctatg
781 tacaaggatc tttttgacga agggcgctat gcatctgatg ttcttgccgg tatggacgag
841 gctattgctg atgggtgttg tgtaatttca atatcaatgg gatttgatga gaccccggtg
901 tatgaagatc ctatagcaat tgccctcattc gctgctacag agaagggcgt agtgggtctca
15 961 tcttcagcag gaaatgcagg gccagcgcta gggagcttgc acaatggaat cccatggagc
1021 ttaactgttg cagctggaac cattgaccgt tcatttgagc gcactataac tcttgggagt
1081 ggggaaacca tcattggatg gacaatgttc ccagccagtg cttatgtagc agacttgcca
1141 ctgctttata acaagactta ctctgcatgc aactcaactc gattattatc tcaactccga
1201 actgacgcca tcatcgatg cgaagaagct gaagattcgg tatctgagca aatatctggt
20 1261 gtcagtgcac cgaacattcg gggagccata tttgtttcag attatgatgc tgaattattt
1321 gaacttggtg gtgtgactat tcctgggtgtc gtgattagca ccaaggatgc accggctgtg
1381 atcagctacg ccagcaatga tgtgaaacct aaggcaagca tcaagttcca acaaactggt
1441 ctgggcacaa agcctgcacc agccgtgggt ttctatactt ctagagggtcc gtcaccgagc

1501 tatccaggca tcttaaagcc agatataatg gccctgggt cactagtttt tgctgcttgg
 1561 attccaaata ctgctacagc ccaaattggg ttgaataccc tcttgacaag tgaatacaat
 1621 atggtttctg gaacatcaat ggctgacct catgctgctg gtgtagctgc tctccttaag
 1681 ggcgcacacc ctgaatggag tgcagctgct attaggtctg caatgatgac tacagcaaat
 5 1741 cccttggata acacactaaa tccaatccgg gacaatgggc taatcaattt cacatctgct
 1801 tcaccttttag ctatgggagc cggccaagtt gatcctaata gggcacttga tcttggtttg
 1861 atttatgaaa ccaccccaca agattatgtg agcctcctct gcactctgaa cttcacccaa
 1921 aaccaaattcc tgtccattac aagatcaaac cgttacagct gctccacccc taatcctgat
 1981 cttactatc cttcttttat tactttacac tacaacacaa atgcaacatt tggtcagact
 10 2041 tttcacagga ctgtgactaa cgttggagga agcgctacaa cttacaaggc caagatcact
 2101 gctcctctag gttctgtagt tagtgtctca ccagacacat tggccttcag aaagcagtat
 2161 gagcagcaga gctacgagct cactattgag tacaagcctg atggtgaaga aactgtttca
 2221 tttggggaac ttgtttggat tgaagaaaat gggaatcaca ctgtgaggag ccctattaca
 2281 gtgtcacctt ccatgagtaa ctttgtgttt atgggtacac aataa

15 Au polynucléotide ainsi traduit correspond une protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10, composée de 774 acides aminés et reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 10 :

1 M R S R N G V L H L F L F V L A W L L L A A L H A N S S S D
 31 E R S T Y I V H M D K T H M P K T F S S P H H W Y S S V V R
 20 61 S L K S T K P T K L N R R R S S P L L V Y S Y D N A A H G F
 91 S A V L S Q Q E L E T L K K S P G F V S V Y A D K T A T L D
 121 T T H T P E F L S L N T A N G L W P A S K Y G E D I I V G V
 151 I D S G V W P E S E S Y N D D G M G A I P S R W K G E C E A
 181 G Q E F N S S M C N S K L I G A R Y F D K G I I A A N P G I
 25 211 N I S M K S A R D T M G H G T H T S S T V A G N Y V D G V S

241 F F G Y A K G T A K G V A P R A R V A M Y K V I F D E G R Y
 271 A S D V L A G M D A A I A D G V D V I S I S M G F D E T P L
 301 Y E D P I A I A S F A A T E K G V V V S S S A G N A G P A L
 331 G S L H N G I P W T L T V A A G T I D R S F A G T I T L G S
 5 361 G E T I I G W T M F P A S A Y V A D L P L L Y N K T Y S A C
 391 N S T R L L S Q L R T D A I I V C E E A E D S V S E Q I S V
 421 V S A S N I R G A I F V S D Y D A E L F E L G G V T I P G V
 451 V I S T K D A P A V I S Y A S N D V K P K A S I K F Q Q T V
 481 L G T K P A P A V A F Y T S R G P S P S Y P G I L K P D I M
 10 511 A P G S L V F A A W I P N T A T A Q I G L N T L L T S E Y N
 541 M V S G T S M A C P H A A G V A A L L K G A H P E W S A A A
 571 I R S A M M T T A N P L D N T L N P I R D N G L I N F T S A
 601 S P L A M G A G Q V D P N R A L D P G L I Y E T T P Q D Y V
 631 S L L C T L N F T Q N Q I L S I T R S N R Y S C S T P N P D
 15 661 L N Y P S F I T L H Y N T N A T F V Q T F H R T V T N V G G
 691 S A T T Y K A K I T A P L G S V V S V S P D T L A F R K Q Y
 721 E Q Q S Y E L T I E Y K P D G E E T V S F G E L V W I E E N
 751 G N H T V R S P I T V S P S M S N F V F M G T Q

20 **Exemple 2 : préparation de l'ADNc complet codant pour l'hétérocarpine pour une production d'hétérocarpine recombinante :**

2.1) Préparation des ARNs à partir de culture de cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* :

Les cellules en culture sont conservés à -80° C avant les étapes d'extraction des ARNs totaux. L'extraction des ARNs totaux est basée sur une technique décrite dans la littérature scientifique (Chomczynski et Sacchi, *Anal. Biochem.* (1987), **162**, 156) à
 25 l'aide du réactif Trizol (Gibco/BRL). La qualité des ARNs ainsi extraits est analysée sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium.

2.2) Transcription inverse à partir des ARN :

Les ARNs totaux sont transcrits de manière inverse avec des amorces Oligo(dT) en utilisant la transcriptase inverse Superscript® comme suggéré dans le manuel du fabricant (Gibco/BRL).

5 2.3) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur les produits obtenus à partir de la transcription inverse :

L'amplification de l'ADNc de l'hétérocarpine a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur les produits de la transcription inverse en utilisant l'amorce Fwd2 et Rev2 de séquences respectives SEQ. ID. NO. 11 et SEQ. ID. NO. 12.

10 Les séquences SEQ. ID. NO. 11 et SEQ. ID. NO. 12 sont les suivantes :

- SEQ. ID. NO. 11 :

5'-GGG GGA TCC GAG GTC TAG GAA TGG TGT TCT TCA-3'

- SEQ. ID. NO. 12 :

5'-GGG CTC GAG TTG TGT ACC CAT AAA CAC AAA GTT ACT CAT GG-3'

15 L'amorce Fwd2 correspond aux nucléotides 118 à 140 de SEQ. ID. NO. 8 et inclut un site BamH1 (souligné) et trois nucléotides additionnels en partie 5' pour faciliter le clonage. L'amorce Rev2 correspond à la séquence complémentaire de la région contenant les nucléotides 2405 à 2436 de SEQ. ID. NO. 8 et inclut un site Xho1 (souligné) et trois nucléotides additionnels en partie 5' pour faciliter le clonage.

20 Les conditions de réaction incluent 50 ng des ADNc produits de la réaction de transcription inverse décrite ci-dessus, 0,2 µM de Fwd2 (SEQ. ID. NO. 11) et de Rev2 (SEQ. ID. NO. 12), 200 µM dNTPs, 40 mM Tricine-KOH (pH 8,7), 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(Oac)₂, 3,75 µg/ml BSA, 0,005% Tween-20, 0,005% Nonidet-P40, et 0,5 U Taq ADN polymérase dans un volume final de 50 µl. Les réactions de PCR sont
25 réalisées sur un thermocycleur Perkin-Elmer 9700 en utilisant les paramètres de cycles thermiques suivants : 5 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 72 °C, 5 cycles comprenant une dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 70° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant 3 minutes et enfin 25 cycles comprenant une
30 dénaturation à 94° C pendant 5 s, une hybridation des amorces à 68° C pendant 10 s, et une extension de polymérisation à 72° C pendant 3 minutes.

Les produits obtenus par la PCR sont séparés sur gel d'agarose 1% et visualisés à l'aide d'une coloration au bromure d'éthidium. Une bande d'environ 2,3 kb est obtenue.

La séquence en acides nucléiques du produit de PCR est vérifiée à l'aide d'un séquenceur automatique et correspond à la séquence SEQ. ID. NO. 9 ayant subi artificiellement une délétion du codon initiateur ATG afin de permettre l'expression de l'hétérocarpine recombinante à partir du vecteur pQE-TriSystem (Qiagen) en phase avec le site BamH1 ainsi qu'une délétion du codon stop pour conserver la traduction en phase de la protéine et ainsi permettre la synthèse d'une séquence 8xHis dans la région C-terminale de l'hétérocarpine. Cette séquence correspond à la séquence SEQ. ID. NO. 13 reproduite ci-après :

- SEQ. ID. NO. 13 :

```

1  gggggatccg aggtctagga atggtgttct tcattttattc cttttcgttc ttgcatggct
61  tctgttggcg gctctccatg ctaactcaag ttcggatgag agatcaacat atatagttca
121 tatggacaag acccatatgc ccaaacctt ctctagcccc caccattggt actcttcggt
15 181 cgttcgatcc ctcaagtcta caaagccaac caaattaaat cgccgtcgat cctcaccact
241 tcttgtatac tcttacgaca atgctgctca tggtttcagt gcagttttat ctcaacagga
301 acttgaaact ctaaaaaagt ctccaggttt cgtctcagtt tatgccgata agacagcgac
361 acttgacacc acccatcac ctgaatttct ctccctgaat actgccaacg ggttgtggcc
421 tgcttcaaag tatggtgaag atataattgt tgggtgttatt gacagcgggtg tctggccgga
20 481 gagtgaaagt tataatgatg atggtatggg cgctattcca agcagatgga agggagaatg
541 tgaagctgga caagagttca attcctccat gtgcaactca aagcttattg gagctagata
601 ttctcgataag ggtatcattg cggcaaatcc tgggattaac attagcatga aatctgccag
661 agatactatg gggcatggga ctcacacatc ctccacagtt gctgggaatt atgtggatgg
721 cgtttcatte tttggctatg ctaaagggtac agcaaaagga gtggcaccac gggcgagagt
25 781 ggctatgtac aaggtcattt ttgacgaagg gcgctatgca tctgatgttc ttgccggtat
841 ggacgcggct attgctgatg gtgttgatgt aatttcaata tcaatgggat ttgatgagac
901 cccgttgtat gaagatccta tagcaattgc ctcatcgtc gctacagaga agggcgtagt
961 ggtctcatct tcagcaggaa atgcagggcc agcgctaggg agcttgaca atggaatccc
1021 atggacgtta actgttgcat ctggaaccat tgaccgttca tttgcaggca ctataactct
30 1081 tgggagtggt gaaaccatca ttggatggac aatgttccca gccagtgtt atgtagcaga

```

1141 cttgccactg ctttataaca agacttactc tgcatgcaac tcaactcgat tattatctca
 1201 actccgaact gacgccatca tcgtatgcga agaagctgaa gattcgggtat ctgagcaaat
 1261 atctgttgtc agtgcacgca acattcgggg agccatattt gtttcagatt atgatgctga
 1321 attatttgaa cttggtggtg tgactattcc tgggtgctgtg attagcacca aggatgcacc
 5 1381 ggctgtgatc agctacgcca gcaatgatgt gaaacctaag gcaagcatca agttccaaca
 1441 aactgttctg ggcacaaagc ctgcaccagc cgtggctttc tataacttcta gaggtccgtc
 1501 accgagctat ccaggcatct taaagccaga tataatggcc cctggggtcac tagtttttgc
 1561 tgcttggtgatt ccaaatactg ctacagccca aattgggttg aataccctct tgacaagtga
 1621 atacaatatg gtttctggaa catcaatggc ctgccctcat gctgctggtg tagctgctct
 10 1681 ccttaagggc gcacaccctg aatggagtgc agctgctatt aggtctgcaa tgatgactac
 1741 agcaaatccc ttggataaca cactaaatcc aatccgggac aatgggtctaa tcaatttcac
 1801 atctgcttca cttttagcta tgggagccgg ccaagttgat cctaatacggg cacttgatcc
 1861 tggtttgatt tatgaaacca cccacacaaga ttatgtgagc ctctcttgca ctctgaactt
 1921 cacccaaaac caaatcctgt ccattacaag atcaaaccgt tacagctgct ccaccctaa
 15 1981 tcctgatctt aactatcctt cttttattac tttacactac aacacaaatg caacatttgt
 2041 tcagactttt cacaggactg tgactaacgt tggaggaagc gctacaactt acaaggccaa
 2101 gatcactgct cctctaggtt ctgtagttag tgtctcacca gacacattgg ccttcagaaa
 2161 gcagtatgag cagcagagct acgagctcac tattgagtac aagcctgatg gtgaagaaac
 2221 tgtttcattht ggggaacttg tttggattga agaaaatggg aatcacactg tgaggagccc
 20 2281 tattacagtg tcaccttcca tgagtaactt tgtgtttatg ggtacacaac tcgagccc

Cette séquence code pour une protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14 reproduite ci-après :

1 M A I S R E L V D P R S R N G V L H L F L F V L A W L L L A
 31 A L H A N S S S D E R S T Y I V H M D K T H M P K T F S S P
 25 61 H H W Y S S V V R S L K S T K P T K L N R R R S S P L L V Y
 91 S Y D N A A H G F S A V L S Q Q E L E T L K K S P G F V S V
 121 Y A D K T A T L D T T H T P E F L S L N T A N G L W P A S K
 151 Y G E D I I V G V I D S G V W P E S E S Y N D D G M G A I P
 181 S R W K G E C E A G Q E F N S S M C N S K L I G A R Y F D K
 30 211 G I I A A N P G I N I S M K S A R D T M G H G T H T S S T V
 241 A G N Y V D G V S F F G Y A K G T A K G V A P R A R V A M Y

271 K V I F D E G R Y A S D V L A G M D A A I A D G V D V I S I
 301 S M G F D E T P L Y E D P I A I A S F A A T E K G V V V S S
 331 S A G N A G P A L G S L H N G I P W T L T V A A G T I D R S
 361 F A G T I T L G S G E T I I G W T M F P A S A Y V A D L P L
 5 391 L Y N K T Y S A C N S T R L L S Q L R T D A I I V C E E A E
 421 D S V S E Q I S V V S A S N I R G A I F V S D Y D A E L F E
 451 L G G V T I P G V V I S T K D A P A V I S Y A S N D V K P K
 481 A S I K F Q Q T V L G T K P A P A V A F Y T S R G P S P S Y
 511 P G I L K P D I M A P G S L V F A A W I P N T A T A Q I G L
 10 541 N T L L T S E Y N M V S G T S M A C P H A A G V A A L L K G
 571 A H P E W S A A A I R S A M M T T A N P L D N T L N P I R D
 601 N G L I N F T S A S P L A M G A G Q V D P N R A L D P G L I
 631 Y E T T P Q D Y V S L L C T L N F T Q N Q I L S I T R S N R
 661 Y S C S T P N P D L N Y P S F I T L H Y N T N A T F V Q T F
 15 691 H R T V T N V G G S A T T Y K A K I T A P L G S V V S V S P
 721 D T L A F R K Q Y E Q Q S Y E L T I E Y K P D G E E T V S F
 751 G E L V W I E E N G N H T V R S P I T V S P S M S N F V F M
 781 G T Q L E H H H H H H H H

Exemple 3 : production d'hétérocarpine recombinante par des bactéries :

- 20 La partie de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine est insérée aux sites BamH1/Xho1 du vecteur d'expression pQE-TriSystem (Qiagen) et est exprimé en utilisant les bactéries *E. coli* M15 comme bactéries hôtes. 20 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine sont inoculés et les bactéries mises à 37 °C sous agitation pendant 12 h. A partir de cette culture, 1 litre de milieu LB contenant
 25 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine est inoculé et les bactéries sont mises sous agitation à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,6.

L'expression de l'hétérocarpine recombinante est réalisée par l'addition d'IPTG à la concentration finale de 1 mM pendant 4 à 5 h. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation à 4000xg pendant 20 min puis congelées dans l'azote liquide. Le culot est
 30 ensuite décongelé dans la glace pendant 15 min et suspendu dans un tampon de lyse pH 8,0 composé de 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl et 10 mM imidazole en présence de 1 mg/ml de lysozyme pendant 30 min dans la glace. La lyse est finalement complétée par une étape de sonication et les débris éliminés par centrifugation. Le lysat (4 ml) ainsi clarifié est mélangé avec 1 ml d'une suspension de matrice de nickel et mis en
 35 agitation à 4 °C pendant 60 min. L'ensemble du milieu réactionnel est placé dans une colonne, lavé en présence de 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl et 20 mM imidazole.

L'hétérocarpine est finalement éluée avec 4x 0,5 ml de tampon constitué de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 250 mM imidazole.

Exemple 4 : production d'Hétérocarpine recombinante par des cellules d'insectes infectées par le baculovirus :

- 5 La partie de l'ADNc codant pour l'Hétérocarpine est insérée aux sites BamH1/Xho1 du vecteur d'expression pQE-TriSystem (Qiagen). Le vecteur pQE-TriSystem contient les séquences virales de *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) permettant la recombinaison homologue. Le baculovirus recombinant contenant la séquence de l'hétérocarpine est préparé par co-transfection du vecteur pQE-TriSystem
- 10 avec l'ADN linéarisé génomique du baculovirus dans des cellules d'insecte sf9 ou sf21 établies à partir de tissus ovarien de la larve *Spodoptera frugiperda*. Les cellules transfectées sont lavées avec du tampon phosphate et collectées par centrifugation à 1000xg pendant 5 min. Le culot est suspendu dans un tampon de lyse pH 8,0 composé de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 10 mM imidazole. La lyse est finalement
- 15 complétée par une étape de sonication et les débris éliminés par centrifugation. Le lysat (4 ml) ainsi clarifié est mélangé avec 200 μl d'une suspension de matrice de nickel et mis en agitation à 4 °C pendant 60 min. L'ensemble du milieu réactionnel est placé dans une colonne, lavé en présence de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 20 mM imidazole. L'hétérocarpine est finalement éluée avec 4x 0,5 ml de tampon constitué de 50 mM
- 20 NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl et 250 mM imidazole.

Exemple 5 : production d'Hétérocarpine recombinante par des cellules de mammifères :

- La partie de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine est insérée aux sites BamH1/Xho1 du vecteur d'expression pQE-TriSystem (Qiagen). Le vecteur pQE-TriSystem contient les
- 25 séquences activatrices du cytomegalovirus (CMV) fusionnées au promoteur beta-actine de poulet permettant une expression hétérologue très importante. Des cellules humaines embryonnaires de rein (HEK-293) sont cultivées dans du milieu DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco) contenant 100 U/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sulfate de streptomycine, complémentée avec du sérum de veau fœtal à 10%. Les cellules sont
- 30 sous-cultivées 24 h avant le protocole de transfection permettant un métabolisme normal des cellules et une meilleure efficacité de transfection. La transfection de 1 μg de pQE-TriSystem contenant l'ADNc codant pour l'hétérocarpine a été réalisée en utilisant le réactif Effectene[®] selon les recommandations du fabricant (Qiagen).

Les cellules transfectées sont lavées avec du tampon phosphate et collectées par centrifugation à 1000xg pendant 5 min. Le culot est suspendu dans un tampon de lyse pH 8,0 composé de 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole en présence de 0,05% Tween® 20. La lyse est finalement complétée par une étape de sonication et les débris éliminés par centrifugation. Le lysat (4 ml) ainsi clarifié est mélangé avec 200 µl d'une suspension de matrice de nickel et mis en agitation à 4 °C pendant 60 min. L'ensemble du milieu réactionnel est placé dans une colonne, lavé en présence de 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl et 20 mM imidazole. L'hétérocarpine est finalement éluee avec 4x 0,5 ml de tampon constitué de 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl et 250 mM imidazole.

Exemple 6 : mesure de la liaison au récepteur humain à GHRH :

Transfections stables du récepteur humain à GHRH (hGHRH-R) :

Les cellules humaines embryonnaires de reins, HEK-293, (une lignée cellulaire développée par le Dr. Stuart Sealfon, Mount Sinai Medical School, New York, New York) exprimant de manière stable le récepteur humain à GHRH ont été obtenues du Dr. Kelly Mayo (Northwestern University, Chicago, IL).

Culture cellulaire et préparation membranaire :

Les cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec le récepteur humain à GHRH décrites ci-dessus sont cultivées en DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco, forte teneur en glucose ; fourni par Life technologies) supplémenté avec 0,4 mg/ml de G418 (Life technologies) en présence de 10 % de sérum de veau fœtal et de 4 mM de L-glutamine (Life technologies). Les cellules sont homogénéisées dans le tampon A contenant 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 2 mM d'acide éthylèneglycol-bis(2-amino-éthyl)-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA) et 50 µg/ml de bacitracine puis sont soumises à sonication dans le même tampon A. Les cellules ainsi homogénéisées sont centrifugées à 4° C à 39 000 g pendant 10 minutes, suspendues dans le tampon A et re-centrifugées à 4° C à 40 000 g pendant 10 minutes. Les protéines totales membranaires sont quantifiées par la technique de Bradford. Les membranes culottées sont ainsi stockées à -80° C pour une utilisation ultérieure.

Test de liaison compétitive sur hGHRH-R :

Les membranes des cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec le récepteur humain à GHRH sont diluées à la concentration de 100 µg/ml dans le tampon réactionnel contenant 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM de MgCl₂, 2 mM d'EGTA,

50 µg/ml de bacitracine et 0,5 % d'albumine de sérum bovin (BSA). Les membranes sont incubées avec 0,05 nM de [¹²⁵I]GHRH(1-44 amide) (Amersham) dans un volume final de 200 µl en présence de concentrations croissantes d'hétérocarpine pendant 2 heures à 23° C. La réaction est arrêtée par une filtration rapide sur des filtres 96 puits GF/C pré-chargés à 0,1 % en polyéthylènimine. Les filtres sont ensuite lavés trois fois à 4° C avec du tampon de lavage contenant 50 mM Tris (pH 7,4) en utilisant une station de filtration Packard 96 puits. Les filtres ainsi séchés sont submergés de 20 µl de cocktail scintillant (Microscint O, Packard) et sont soumis à un comptage sur le Topcount (Packard). L'activité non-spécifique est déterminée en présence de 100 nM de hGHRH. Une courbe dose-réponse est générée pour hGHRH (0,001 nM-100 nM) et permet de déterminer la concentration inhibitrice CI₅₀ de protéine / de polypeptide à laquelle 50% du GHRH humain n'est pas fixé sur le récepteur humain à GHRH.

Revendications

1. Polynucléotide isolé comprenant la séquence SEQ. ID. NO. 8 ou un de ses fragments.
2. Polynucléotide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 8.
- 5 3. Polynucléotide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 9.
4. Polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 4, SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 11 ou SEQ. ID. NO. 12.
5. Polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 13.
- 10 6. Polypeptide isolé comprenant la séquence SEQ. ID. NO. 14 ou un de ses fragments.
7. Polypeptide isolé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide de séquence SEQ. ID. NO. 14.
8. Vecteur d'expression contenant un polynucléotide de séquence SEQ. ID. NO. 13.
9. Cellule hôte transformée ou transfectée par un vecteur d'expression selon la
15 revendication 8.
10. Procédé de préparation d'un polypeptide isolé comprenant la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou un des fragments de cette dernière ou bien par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou un des fragments de cette dernière, ledit
20 polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, ladite méthode de préparation comprenant les étapes successives suivantes :
 - (a) culture, dans des conditions convenables pour obtenir l'expression dudit polypeptide
25 d'une cellule hôte transformée ou transfectée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide isolé comprenant la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13, la séquence complémentaire à la séquence polynucléotidique

- SEQ. ID. NO. 9 ou SEQ. ID. NO. 13 ou encore un des fragments de ces dernières, ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et
- 5 (b) isolement du polypeptide à partir des cultures de cellules hôtes.
11. Anticorps ou fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 14 mais pas la protéine de séquence SEQ. ID. NO. 10.
12. En tant que médicament, un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3.
- 10 13. En tant que médicament, un polypeptide selon la revendication 6 ou 7.
14. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3.
15. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polypeptide selon la revendication 6 ou 7.
- 15 16. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.
17. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 6 ou 7 pour préparer un médicament destiné à traiter une maladie proliférative.
- 20 18. Méthode pour l'identification de composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire, laquelle comprend les étapes successives suivantes :
- (a) mise en contact de chaque composé candidat, dans des conditions et pendant un temps suffisant pour permettre à l'agent candidat de se fixer au polypeptide, avec un polypeptide isolé comprenant :
- 25 - soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 9,
- soit un fragment de la protéine codée par la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13 ou par une séquence complémentaire de la séquence polynucléotidique SEQ. ID. NO. 13,
- 30

ledit polypeptide isolé ayant au moins une activité immunologique et/ou biologique caractéristique d'une protéine fixant le GHRH humain et étant associée à la modulation de la prolifération cellulaire, et

- 5 (b) détection de la fixation de chaque composé candidat audit polypeptide et identification, parmi les composés candidats, des composés susceptibles de fixer le GHRH humain et de moduler la prolifération cellulaire.

RS 331 PCT - PatentIn sequence listing.txt
SEQUENCE LISTING

<110> SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES
(S.C.R.A.S.)

<120> Procédé de préparation d'hétérocarpine recombinante

<130> RS 331 PCT

<150> FR 02/15563

<151> 2002-12-10

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment peptidique)

<400> 1

Lys Leu Ile Gly Ala Arg Tyr Phe Asp Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment peptidique)

<400> 2

Tyr Gly Glu Asp Ile Ile Val Gly Val Ile Asp Ser Gly Val
1 5 10

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment peptidique)

<400> 3

Pro Glu Ser Glu Ser Tyr
1 5

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce pour produits d'ADNc spécifiques 5'

<400> 4

tcacaagcagc aaaaactagt gacccagggg ccattatattc t

41

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce pour produits d'ADNc spécifiques 3'

<400> 5

cggtatggac gcggctattg ctgatgggtgt tgatgtaa

38

<210> 6

<211> 1675

<212> DNA

<213> Pilocarpus Heterophyllus (fragment d'ADNc 5' de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine)

<400> 6

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggatgcccc 60

aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttgttggt ttgtcaaagc agcaatgagg 120

tctaggaatg gtgttcttca ttatttcctt ttcgttcttg catggccttct gttggcggct 180

ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaagacc 240

catatgcccc aaaccttctc tagcccccac cattgggtact cttcgggtcgt tcgatccctc 300

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

```

aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgatcct caccacttct tgtatactct 360
tacgacaatg ctgctcatgg ttccagtgc gttttatctc aacaggaact tgaaactcta 420
aaaaagtctc cagggttcgt ctccagttat gccgataaga cagcgacact tgacaccacc 480
catacacctg aatttctctc cctgaatact gccaacgggt tgtggcctgc ttcaaagtat 540
ggtgaagata taattgttgg tgttattgac agcgggtgtct ggccggagag tgaaagttat 600
aatgatgatg gtatgggagc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggacaa 660
gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatattt cgataagggt 720
atcattgcgg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgggg 780
catgggactc acacatcctc cacagttgct ggggaattatg tggatggcgt ttcattcttt 840
ggctatgcta aaggtagcgc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtacaag 900
gtcatttttg acgaagggag ctatgcatct gatgttcttg ccggtatgga cgcggctatt 960
gctgatggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatgaa 1020
gacatctatg caattgcctc attcgtgct acagagaagg gcgtagtggt ctcatcttca 1080
gcaggaaatg caggggcagc gctaggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaact 1140
gttgtagctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gagtggggaa 1200
accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgctt 1260
tataacaaga cttactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactgac 1320
gccatcatcg tatgcgaaga agctgaagat tcggtatctg agcaaataatc tgttgtcagt 1380
gcatcgaaca ttccggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaactt 1440
ggtggtgtga ctattcctgg tgtcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatcagc 1500
tacgccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgggc 1560
acaaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatcca 1620
ggcatcttaa agccagatat aatggcccct gggtcactag tttttgctgc ttgga 1675

```

<210> 7

<211> 1689

<212> DNA

<213> *Pilocarpus Heterophyllus* (fragment d'ADNC 3' de l'ADNC codant pour l'hétérocarpine)

<400> 7

```

cggtagggac gcggctattg ctgatggtgt tgatgtaatt tcaatatcaa tgggatttga 60
tgagaccccc ttgtatgaag atcctatagc aattgcctca ttcgctgcta cagagaaggg 120
cgtagtggtc tcatcttcag caggaaatgc agggccagcg ctaggagct tgcacaatgg 180
aatcccatgg acgttaactg ttgcagctgg aaccattgac cgttcatttg caggcactat 240

```


RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

aactcttggg agtggggaaa ccatcattgg atggacaatg ttcccagcca gtgcttatgt	300
agcagacttg ccactgcttt ataacaagac ttactctgca tgcaactcaa ctcgattatt	360
atctcaactc cgaactgacg ccatcatcgt atgcgaagaa gctgaagatt cggatatctga	420
gcaaatatct gttgtcagtg catcgaacat tcggggagcc atatttgttt cagattatga	480
tgctgaatta tttgaacttg gtggtgtgac tattcctggt gtcgtgatta gcaccaagga	540
tgcaccggct gtgatcagct acgccagcaa tgatgtgaaa cctaaggcaa gcatcaagtt	600
ccaacaaact gttctgggca caaagcctgc accagccgtg gctttctata cttctagagg	660
tccgtcaccg agctatccag gcatcttaaa gccagatata atggcccctg ggtcactagt	720
ttttgctgct tggattccaa atactgctac agcccaaatt ggtttgaata ccctcttgac	780
aagtgaatac aatatggttt ctggaacatc aatggcctgc cctcatgctg ctggtgtagc	840
tgctctcctt aagggcgcac accctgaatg gagtgcagct gctattaggt ctgcaatgat	900
gactacagca aatcccttgg ataacacact aaatccaatc cgggacaatg gtctaataca	960
tttcacatct gcttcacctt tagctatggg agccggccaa gttgatccta atcgggcact	1020
tgatcctggt ttgatttatg aaaccacccc acaagattat gtgagcctcc tctgcactct	1080
gaacttcacc caaaaccaa tcctgtccat tacaagatca aaccggtaca gctgctccac	1140
ccctaatacct gatcttaact atccttcttt tattacttta cactacaaca caaatgcaac	1200
atgtgttcag acttttcaca ggactgtgac taacgttgga ggaagcgcta caacttaca	1260
ggccaagatc actgctcctc taggttctgt agttagtgtc tcaccagaca cattggcctt	1320
cagaaagcag tatgagcagc agagctacga gctcactatt gagtacaagc ctgatggtga	1380
agaaactgtt tcatttgggg aacttgtttg gattgaagaa aatgggaatc aactgtgag	1440
gagccctatt acagtgtcac cttccatgag taactttgtg tttatgggta cacaataatt	1500
gataaaaatt tgttctgac acaactgtgg gaataatcga cgtttatgaa cccagaataa	1560
gttggttggt cgtcttcaac attatcataa aggacttgaa tcatgtgtgt tgattttctg	1620
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagtactctg cgttgatacc actgcttgcc ctatagttag	1680
tcgtattag	1689

<210> 8

<211> 2630

<212> DNA

<213> Pilocarpus Heterophyllus (ADNc codant pour l'hétérocarpine)

<400> 8

ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggatgcccc	60
aagctaattc ttatcttttt tctttctttt tgttgttggt ttgtcaaagc agcaatgagg	120
tctaggaatg gtgttcttca tttattcctt ttcgttcttg catggcttct gttggcggct	180

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

ctccatgcta actcaagttc ggatgagaga tcaacatata tagttcatat ggacaagacc	240
catatgcccc aaaccttctc tagccccac cattggtact cttcggtcgt tcgatccctc	300
aagtctacaa agccaaccaa attaaatcgc cgtcgatcct caccacttct tgtatactct	360
tacgacaatg ctgctcatgg tttcagtgc gttttatctc aacaggaact tgaaactcta	420
aaaaagtctc caggtttcgt ctcagtttat gccgataaga cagcgacact tgacaccacc	480
catacacctg aattttctct cctgaatact gccaacgggt tgtggcctgc ttcaaagtat	540
ggtgaagata taattgttgg tgttattgac agcgggtgtc ggccggagag tgaaagttat	600
aatgatgatg gtatgggcgc tattccaagc agatggaagg gagaatgtga agctggacaa	660
gagttcaatt cctccatgtg caactcaaag cttattggag ctagatattt cgataagggt	720
atcattgcgg caaatcctgg gattaacatt agcatgaaat ctgccagaga tactatgggg	780
catgggactc acacatcctc cacagttgct gggaattatg tggatggcgt ttcattcttt	840
ggctatgcta aagggtacagc aaaaggagtg gcaccacggg cgagagtggc tatgtacaag	900
gtcatttttg acgaagggcg ctatgcatct gatgttcttg ccggtatgga cgcggtatt	960
gctgatggtg ttgatgtaat ttcaatatca atgggatttg atgagacccc gttgtatgaa	1020
gatcctatag caattgcctc attcgtgct acagagaagg gcgtagtggt ctcattctca	1080
gcaggaaatg cagggccagc gctagggagc ttgcacaatg gaatcccatg gacgttaact	1140
gttgacagctg gaaccattga ccgttcattt gcaggcacta taactcttgg gagtggggaa	1200
accatcattg gatggacaat gttcccagcc agtgcttatg tagcagactt gccactgctt	1260
tataacaaga cttactctgc atgcaactca actcgattat tatctcaact ccgaactgac	1320
gccatcatcg tatgcgaaga agctgaagat tcggtatctg agcaaatac tgttgctcagt	1380
gcatcgaaca ttcggggagc catatttggt tcagattatg atgctgaatt atttgaactt	1440
ggtggtgtga ctattcctgg tgtcgtgatt agcaccaagg atgcaccggc tgtgatcagc	1500
tacgccagca atgatgtgaa acctaaggca agcatcaagt tccaacaaac tgttctgggc	1560
acaagcctg caccagccgt ggctttctat acttctagag gtccgtcacc gagctatcca	1620
ggcatcttaa agccagatat aatggcccct gggtcactag tttttgctgc ttggattcca	1680
aatactgcta cagcccaaat tggtttgaat accctcttga caagtgaata caatatggtt	1740
tctggaacat caatggcctg ccctcatgct gctggtgtag ctgctctcct taagggcgca	1800
caccctgaat ggagtgcagc tgctattagg tctgcaatga tgactacagc aaatcccttg	1860
gataacacac taaatccaat ccgggacaat ggtctaatac atttcacatc tgcttcacct	1920
ttagctatgg gagccggcca agttgatcct aatcgggcac ttgatcctgg tttgatttat	1980
gaaaccaccc cacaagatta tgtgagcctc ctctgcactc tgaacttcac ccaaaaccaa	2040
atcctgtcca ttacaagatc aaaccgttac agctgctcca cccctaatac tgatcttaac	2100
tatccttctt ttattacttt aactacaac acaaatgcaa catttggtca gacttttcac	2160
aggactgtga ctaacgttgg aggaagcgct acaacttaca aggccaagat cactgctcct	2220

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

ctaggttctg tagttagtgt ctcaccagac acattggcct tcagaaagca gtatgagcag	2280
cagagctacg agctcactat tgagtacaag cctgatggtg aagaaactgt ttcatttggg	2340
gaacttgttt ggattgaaga aaatgggaat cacactgtga ggagccctat tacagtgtca	2400
ccttccatga gtaactttgt gtttatgggt acacaataat tgataaaaat ttgttctgat	2460
cacaactgtg ggaataatcg acgtttatga acccagaata agttgtttgg tcgtcttcaa	2520
cattatcata aaggacttga atcatgtgtg ttgattttct gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2580
aaagtactct gcgttgatac cactgcttgc cctatagtga gtcgtattag	2630

<210> 9

<211> 2325

<212> DNA

<213> Pilocarpus Heterophyllus (partie codante de l'ADNc codant pour l'hétérocarpine)

<400> 9

atgaggtcta ggaatggtgt tcttcattta ttccttttcg ttcttgcag gcttctgttg	60
gcggctctcc atgctaactc aagttcggat gagagatcaa catatatagt tcatatggac	120
aagacccata tgcccaaac cttctctagc cccaccatt ggtactcttc ggtcgttcga	180
tccctcaagt ctacaaagcc aaccaaatta aatcgccgtc gatcctcacc acttcttgta	240
tactcttacg acaatgctgc tcatggtttc agtgcagttt tatctcaaca ggaacttgaa	300
actctaaaaa agtctccagg tttcgtctca gtttatgccg ataagacagc gacacttgac	360
accacccata cacctgaatt tctctccctg aatactgcca acgggttggtg gcctgcttca	420
aagtatggtg aagatataat tgttgggtgtt attgacagcg gtgtctggcc ggagagtga	480
agttataatg atgatggtat gggcgctatt ccaagcagat ggaagggaga atgtgaagct	540
ggacaagagt tcaattcctc catgtgcaac tcaaagctta ttggagctag atatttcgat	600
aagggatatca ttgcggcaaa tcctgggatt aacattagca tgaaatctgc cagagatact	660
atggggcatg ggactcacac atcctccaca gttgctggga attatgtgga tggcgtttca	720
ttctttggct atgctaaagg tacagcaaaa ggagtggcac cacgggagag agtggctatg	780
tacaaggatc tttttgacga agggcgctat gcatctgatg ttcttgccgg tatggacgag	840
gctattgctg atgggtgttg tgtaatttca atatcaatgg gatttgatga gacccggtg	900
tatgaagatc ctatagcaat tgcctcattc gctgctacag agaaggcggt agtgggtctca	960
tcttcagcag gaaatgcagg gccagcgcta gggagcttgc acaatggaat cccatggacg	1020
ttaactgttg cagctggaac cattgaccgt tcatttgcag gcactataac tcttgggagt	1080
ggggaaacca tcattggatg gacaatgttc ccagccagtg cttatgtagc agacttgcca	1140
ctgctttata acaagactta ctctgcatgc aactcaactc gattattatc tcaactccga	1200
actgacgcca tcatcgtagt cgaagaagct gaagattcgg tatctgagca aatatctgtt	1260

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

```

gtcagtgcac cgaacattcg gggagccata tttgtttcag attatgatgc tgaattatTT 1320
gaacttggtg gtgtgactat tcctgggtgtc gtgattagca ccaaggatgc accggctgtg 1380
atcagctacg ccagcaatga tgtgaaacct aaggcaagca tcaagttcca acaaactggt 1440
ctgggcacaa agcctgcacc agccgtggct ttctatactt ctagagggtcc gtcaccgagc 1500
tatccaggca tcttaaagcc agatataatg gcccctgggt cactagtttt tgctgcttgg 1560
attccaaata ctgctacagc ccaaattggt ttgaataccc tcttgacaag tgaatacaat 1620
atggttttctg gaacatcaat ggcctgccct catgctgtgtg gtgtagctgc tctccttaag 1680
ggcgcacacc ctgaatggag tgcagctgct attaggtctg caatgatgac tacagcaaat 1740
cccttgata acacactaaa tccaatccgg gacaatgggc taatcaattt cacatctgct 1800
tcaccttttag ctatgggagc cggccaagtt gatcctaate gggcacttga tcctgggttg 1860
atttatgaaa ccaccccaca agattatgtg agcctcctct gcactctgaa cttcacccaa 1920
aaccaaatcc tgtccattac aagatcaaac cgttacagct gctccacccc taatcctgat 1980
cttaactatc cttcttttat tactttacac tacaacacaa atgcaacatt tgttcagact 2040
tttcacagga ctgtgactaa cgttggagga agcgctacaa cttacaaggc caagatcact 2100
gctcctctag gttctgtagt tagtgtctca ccagacacat tggccttcag aaagcagtat 2160
gagcagcaga gctacgagct cactattgag tacaagcctg atgggtgaaga aactgtttca 2220
tttggggaac ttgtttggat tgaagaaaat gggaatcaca ctgtgaggag ccctattaca 2280
gtgtcacctt ccatgagtaa ctttgtgttt atgggtacac aataa 2325

```

<210> 10

<211> 774

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus (hétérocarpine)

<400> 10

Met Arg Ser Arg Asn Gly Val Leu His Leu Phe Leu Phe Val Leu Ala
 1 5 10 15

Trp Leu Leu Leu Ala Ala Leu His Ala Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg
 20 25 30

Ser Thr Tyr Ile Val His Met Asp Lys Thr His Met Pro Lys Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Pro His His Trp Tyr Ser Ser Val Val Arg Ser Leu Lys Ser
 50 55 60

Thr Lys Pro Thr Lys Leu Asn Arg Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Val
 65 70 75 80

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

Tyr Ser Tyr Asp Asn Ala Ala His Gly Phe Ser Ala Val Leu Ser Gln
 85 90 95
 Gln Glu Leu Glu Thr Leu Lys Lys Ser Pro Gly Phe Val Ser Val Tyr
 100 105 110
 Ala Asp Lys Thr Ala Thr Leu Asp Thr Thr His Thr Pro Glu Phe Leu
 115 120 125
 Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Leu Trp Pro Ala Ser Lys Tyr Gly Glu
 130 135 140
 Asp Ile Ile Val Gly Val Ile Asp Ser Gly Val Trp Pro Glu Ser Glu
 145 150 155 160
 Ser Tyr Asn Asp Asp Gly Met Gly Ala Ile Pro Ser Arg Trp Lys Gly
 165 170 175
 Glu Cys Glu Ala Gly Gln Glu Phe Asn Ser Ser Met Cys Asn Ser Lys
 180 185 190
 Leu Ile Gly Ala Arg Tyr Phe Asp Lys Gly Ile Ile Ala Ala Asn Pro
 195 200 205
 Gly Ile Asn Ile Ser Met Lys Ser Ala Arg Asp Thr Met Gly His Gly
 210 215 220
 Thr His Thr Ser Ser Thr Val Ala Gly Asn Tyr Val Asp Gly Val Ser
 225 230 235 240
 Phe Phe Gly Tyr Ala Lys Gly Thr Ala Lys Gly Val Ala Pro Arg Ala
 245 250 255
 Arg Val Ala Met Tyr Lys Val Ile Phe Asp Glu Gly Arg Tyr Ala Ser
 260 265 270
 Asp Val Leu Ala Gly Met Asp Ala Ala Ile Ala Asp Gly Val Asp Val
 275 280 285
 Ile Ser Ile Ser Met Gly Phe Asp Glu Thr Pro Leu Tyr Glu Asp Pro
 290 295 300
 Ile Ala Ile Ala Ser Phe Ala Ala Thr Glu Lys Gly Val Val Val Ser
 305 310 315 320
 Ser Ser Ala Gly Asn Ala Gly Pro Ala Leu Gly Ser Leu His Asn Gly
 325 330 335
 Ile Pro Trp Thr Leu Thr Val Ala Ala Gly Thr Ile Asp Arg Ser Phe
 340 345 350

Ala	Gly	Thr	Ile	Thr	Leu	Gly	Ser	Gly	Glu	Thr	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr
	355						360					365			
Met	Phe	Pro	Ala	Ser	Ala	Tyr	Val	Ala	Asp	Leu	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asn
	370					375					380				
Lys	Thr	Tyr	Ser	Ala	Cys	Asn	Ser	Thr	Arg	Leu	Leu	Ser	Gln	Leu	Arg
385					390					395					400
Thr	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Cys	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Val	Ser	Glu
				405					410					415	
Gln	Ile	Ser	Val	Val	Ser	Ala	Ser	Asn	Ile	Arg	Gly	Ala	Ile	Phe	Val
			420					425					430		
Ser	Asp	Tyr	Asp	Ala	Glu	Leu	Phe	Glu	Leu	Gly	Gly	Val	Thr	Ile	Pro
		435					440					445			
Gly	Val	Val	Ile	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Ala
	450					455					460				
Ser	Asn	Asp	Val	Lys	Pro	Lys	Ala	Ser	Ile	Lys	Phe	Gln	Gln	Thr	Val
465					470					475					480
Leu	Gly	Thr	Lys	Pro	Ala	Pro	Ala	Val	Ala	Phe	Tyr	Thr	Ser	Arg	Gly
				485					490					495	
Pro	Ser	Pro	Ser	Tyr	Pro	Gly	Ile	Leu	Lys	Pro	Asp	Ile	Met	Ala	Pro
			500					505					510		
Gly	Ser	Leu	Val	Phe	Ala	Ala	Trp	Ile	Pro	Asn	Thr	Ala	Thr	Ala	Gln
		515					520					525			
Ile	Gly	Leu	Asn	Thr	Leu	Leu	Thr	Ser	Glu	Tyr	Asn	Met	Val	Ser	Gly
	530					535					540				
Thr	Ser	Met	Ala	Cys	Pro	His	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Lys
545					550					555					560
Gly	Ala	His	Pro	Glu	Trp	Ser	Ala	Ala	Ala	Ile	Arg	Ser	Ala	Met	Met
				565					570					575	
Thr	Thr	Ala	Asn	Pro	Leu	Asp	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ile	Arg	Asp	Asn
			580					585					590		
Gly	Leu	Ile	Asn	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Pro	Leu	Ala	Met	Gly	Ala	Gly
		595					600					605			
Gln	Val	Asp	Pro	Asn	Arg	Ala	Leu	Asp	Pro	Gly	Leu	Ile	Tyr	Glu	Thr
	610					615					620				

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

Thr Pro Gln Asp Tyr Val Ser Leu Leu Cys Thr Leu Asn Phe Thr Gln
625 630 635 640

Asn Gln Ile Leu Ser Ile Thr Arg Ser Asn Arg Tyr Ser Cys Ser Thr
645 650 655

Pro Asn Pro Asp Leu Asn Tyr Pro Ser Phe Ile Thr Leu His Tyr Asn
660 665 670

Thr Asn Ala Thr Phe Val Gln Thr Phe His Arg Thr Val Thr Asn Val
675 680 685

Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Ile Thr Ala Pro Leu Gly
690 695 700

Ser Val Val Ser Val Ser Pro Asp Thr Leu Ala Phe Arg Lys Gln Tyr
705 710 715 720

Glu Gln Gln Ser Tyr Glu Leu Thr Ile Glu Tyr Lys Pro Asp Gly Glu
725 730 735

Glu Thr Val Ser Phe Gly Glu Leu Val Trp Ile Glu Glu Asn Gly Asn
740 745 750

His Thr Val Arg Ser Pro Ile Thr Val Ser Pro Ser Met Ser Asn Phe
755 760 765

Val Phe Met Gly Thr Gln
770

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce pour produits d'ADNc spécifiques 5'

<400> 11

gggggatccg aggtctagga atggtgttct tca

33

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

<220>

<223> Amorce pour produits d'ADNC spécifiques 3'

<400> 12

gggctcgagt tgtgtaccca taaacacaaa gttactcatg g

41

<210> 13

<211> 2338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ADNC codant pour l'hétérocarpine ayant subi une délétion du codon initiateur et une délétion du codon STOP

<400> 13

gggggatccg aggtctagga atggtgttct tcatttattc cttttcgttc ttgcatggct	60
tctgttggcg gctctccatg ctaactcaag ttcggatgag agatcaacat atatagttca	120
tatggacaag acccatatgc ccaaaacctt ctctagcccc caccattggg actcttcggt	180
cgttcgatcc ctcaagtcta caaagccaac caaattaaat cgccgtcgat ctcaccact	240
tcttgatac tcttacgaca atgctgctca tggtttcagt gcagttttat ctcaacagga	300
acttgaaact ctaaaaaagt ctccagggtt cgtctcagtt tatgccgata agacagcgac	360
acttgacacc acccatacac ctgaatttct ctccctgaat actgccaacg ggttggtggcc	420
tgcttcaaag tatggtgaag atataattgt tgggtgttatt gacagcgggtg tctggccgga	480
gagtgaaagt tataatgatg atggtatggg cgctattcca agcagatgga agggagaatg	540
tgaagctgga caagagttca attcctccat gtgcaactca aagcttattg gagctagata	600
tttcgataag ggtatcattg cggcaaattcc tgggattaac attagcatga aatctgccag	660
agatactatg gggcatggga ctcacacatc ctccacagtt gctgggaatt atgtggatgg	720
cgtttcattc tttggctatg ctaaaggtag agcaaaagga gtggcaccac gggcgagagt	780
ggctatgtac aagggtcattt ttgacgaagg gcgctatgca tctgatgttc ttgccggtat	840
ggacgcggct attgctgatg gtgttgatgt aatttcaata tcaatgggat ttgatgagac	900
cccgttgat gaagatccta tagcaattgc ctcatcgtc gctacagaga agggcgtagt	960
ggtctcatct tcagcaggaa atgcagggcc agcgctaggg agcttgacaca atggaatccc	1020
atggacgtta actgttgcag ctggaaccat tgaccgttca tttgcaggca ctataactct	1080
tgggagtggg gaaaccatca ttggatggac aatgttccca gccagtgcct atgtagcaga	1140
cttgccactg ctttataaca agacttactc tgcagtcaac tcaactcgat tattatctca	1200
actccgaact gacgcatca tcgtatgcga agaagctgaa gattcgggtat ctgagcaaat	1260

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

```

atctgttgtc agtgcacgca acattcgggg agccatattt gtttcagatt atgatgctga 1320
attatttgaa cttggtggtg tgactattcc tgggtgctgtg attagcacca aggatgcacc 1380
ggctgtgatac agctacgcca gcaatgatgt gaaacctaag gcaagcatca agttccaaca 1440
aactgtttctg ggcacaaagc ctgcaccagc cgtggctttc tataacttcta gaggtccgctc 1500
accgagctat ccaggcatct taaagccaga tataatggcc cctgggtcac tagttttttgc 1560
tgcttggtgatt ccaaatactg ctacagccca aattgggtttg aataccctct tgacaagtga 1620
atacaatatg gtttctggaa catcaatggc ctgccctcat gctgctggtg tagctgctct 1680
ccttaagggc gcacaccctg aatggagtgc agctgctatt aggtctgcaa tgatgactac 1740
agcaaatccc ttggataaca cactaaatcc aatccgggac aatggtctaa tcaatttcac 1800
atctgcttca ctttttagcta tgggagccgg ccaagttgat cctaatacggg cacttgatcc 1860
tggtttgatt tatgaaacca cccacaaga ttatgtgagc ctctctgca ctctgaactt 1920
cacccaaaac caaatcctgt ccattacaag atcaaaccgt tacagctgct ccaccctaa 1980
tcctgatctt aactatcctt cttttattac ttactactac aacacaaatg caacatttgt 2040
tcagactttt cacaggactg tgactaacgt tggaggaagc gctacaactt acaaggccaa 2100
gatcactgct cctctagggt ctgtagttag tgtctcacca gacacattgg ccttcagaaa 2160
gcagtatgag cagcagagct acgagctcac tattgagtac aagcctgatg gtgaagaaac 2220
tgtttcattt ggggaacttg tttggattga agaaaatggg aatcacactg tgaggagccc 2280
tattacagtg tcaccttcca tgagtaactt tgtgtttatg ggtacacaac tcgagccc 2338

```

<210> 14

<211> 793

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hétérocarpine recombinante

<400> 14

```

Met Ala Ile Ser Arg Glu Leu Val Asp Pro Arg Ser Arg Asn Gly Val
1           5           10          15

```

```

Leu His Leu Phe Leu Phe Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Ala Ala Leu
          20          25          30

```

```

His Ala Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg Ser Thr Tyr Ile Val His Met
          35          40          45

```

```

Asp Lys Thr His Met Pro Lys Thr Phe Ser Ser Pro His His Trp Tyr
          50          55          60

```

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

Ser Ser Val Val Arg Ser Leu Lys Ser Thr Lys Pro Thr Lys Leu Asn
 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Val Tyr Ser Tyr Asp Asn Ala Ala
 85 90 95
 His Gly Phe Ser Ala Val Leu Ser Gln Gln Glu Leu Glu Thr Leu Lys
 100 105 110
 Lys Ser Pro Gly Phe Val Ser Val Tyr Ala Asp Lys Thr Ala Thr Leu
 115 120 125
 Asp Thr Thr His Thr Pro Glu Phe Leu Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly
 130 135 140
 Leu Trp Pro Ala Ser Lys Tyr Gly Glu Asp Ile Ile Val Gly Val Ile
 145 150 155 160
 Asp Ser Gly Val Trp Pro Glu Ser Glu Ser Tyr Asn Asp Asp Gly Met
 165 170 175
 Gly Ala Ile Pro Ser Arg Trp Lys Gly Glu Cys Glu Ala Gly Gln Glu
 180 185 190
 Phe Asn Ser Ser Met Cys Asn Ser Lys Leu Ile Gly Ala Arg Tyr Phe
 195 200 205
 Asp Lys Gly Ile Ile Ala Ala Asn Pro Gly Ile Asn Ile Ser Met Lys
 210 215 220
 Ser Ala Arg Asp Thr Met Gly His Gly Thr His Thr Ser Ser Thr Val
 225 230 235 240
 Ala Gly Asn Tyr Val Asp Gly Val Ser Phe Phe Gly Tyr Ala Lys Gly
 245 250 255
 Thr Ala Lys Gly Val Ala Pro Arg Ala Arg Val Ala Met Tyr Lys Val
 260 265 270
 Ile Phe Asp Glu Gly Arg Tyr Ala Ser Asp Val Leu Ala Gly Met Asp
 275 280 285
 Ala Ala Ile Ala Asp Gly Val Asp Val Ile Ser Ile Ser Met Gly Phe
 290 295 300
 Asp Glu Thr Pro Leu Tyr Glu Asp Pro Ile Ala Ile Ala Ser Phe Ala
 305 310 315 320
 Ala Thr Glu Lys Gly Val Val Val Ser Ser Ser Ala Gly Asn Ala Gly
 325 330 335

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

Pro Ala Leu Gly Ser Leu His Asn Gly Ile Pro Trp Thr Leu Thr Val
 340 345 350

Ala Ala Gly Thr Ile Asp Arg Ser Phe Ala Gly Thr Ile Thr Leu Gly
 355 360 365

Ser Gly Glu Thr Ile Ile Gly Trp Thr Met Phe Pro Ala Ser Ala Tyr
 370 375 380

Val Ala Asp Leu Pro Leu Leu Tyr Asn Lys Thr Tyr Ser Ala Cys Asn
 385 390 395 400

Ser Thr Arg Leu Leu Ser Gln Leu Arg Thr Asp Ala Ile Ile Val Cys
 405 410 415

Glu Glu Ala Glu Asp Ser Val Ser Glu Gln Ile Ser Val Val Ser Ala
 420 425 430

Ser Asn Ile Arg Gly Ala Ile Phe Val Ser Asp Tyr Asp Ala Glu Leu
 435 440 445

Phe Glu Leu Gly Gly Val Thr Ile Pro Gly Val Val Ile Ser Thr Lys
 450 455 460

Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Tyr Ala Ser Asn Asp Val Lys Pro Lys
 465 470 475 480

Ala Ser Ile Lys Phe Gln Gln Thr Val Leu Gly Thr Lys Pro Ala Pro
 485 490 495

Ala Val Ala Phe Tyr Thr Ser Arg Gly Pro Ser Pro Ser Tyr Pro Gly
 500 505 510

Ile Leu Lys Pro Asp Ile Met Ala Pro Gly Ser Leu Val Phe Ala Ala
 515 520 525

Trp Ile Pro Asn Thr Ala Thr Ala Gln Ile Gly Leu Asn Thr Leu Leu
 530 535 540

Thr Ser Glu Tyr Asn Met Val Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro His
 545 550 555 560

Ala Ala Gly Val Ala Ala Leu Leu Lys Gly Ala His Pro Glu Trp Ser
 565 570 575

Ala Ala Ala Ile Arg Ser Ala Met Met Thr Thr Ala Asn Pro Leu Asp
 580 585 590

Asn Thr Leu Asn Pro Ile Arg Asp Asn Gly Leu Ile Asn Phe Thr Ser
 595 600 605

RS 331 PCT - Patentin sequence listing.txt

Ala Ser Pro Leu Ala Met Gly Ala Gly Gln Val Asp Pro Asn Arg Ala
 610 615 620
 Leu Asp Pro Gly Leu Ile Tyr Glu Thr Thr Pro Gln Asp Tyr Val Ser
 625 630 635 640
 Leu Leu Cys Thr Leu Asn Phe Thr Gln Asn Gln Ile Leu Ser Ile Thr
 645 650 655
 Arg Ser Asn Arg Tyr Ser Cys Ser Thr Pro Asn Pro Asp Leu Asn Tyr
 660 665 670
 Pro Ser Phe Ile Thr Leu His Tyr Asn Thr Asn Ala Thr Phe Val Gln
 675 680 685
 Thr Phe His Arg Thr Val Thr Asn Val Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr
 690 695 700
 Lys Ala Lys Ile Thr Ala Pro Leu Gly Ser Val Val Ser Val Ser Pro
 705 710 715 720
 Asp Thr Leu Ala Phe Arg Lys Gln Tyr Glu Gln Gln Ser Tyr Glu Leu
 725 730 735
 Thr Ile Glu Tyr Lys Pro Asp Gly Glu Glu Thr Val Ser Phe Gly Glu
 740 745 750
 Leu Val Trp Ile Glu Glu Asn Gly Asn His Thr Val Arg Ser Pro Ile
 755 760 765
 Thr Val Ser Pro Ser Met Ser Asn Phe Val Phe Met Gly Thr Gln Leu
 770 775 780
 Glu His His His His His His His His
 785 790

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/29 C07K14/415 C07K16/16 A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, L	WO 02/068461 A (THURIEAU CHRISTOPHE ; FERRANDIS ERIC (FR); TENG BENG POON (FR); SOD) 6 September 2002 (2002-09-06) cited in the application L: priorité the whole document -----	1-3, 5-18

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 2004

Date of mailing of the international search report

17/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/03629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02068461 A	06-09-2002	FR 2821359 A1	30-08-2002
		BR 0207578 A	02-03-2004
		CA 2437516 A1	06-09-2002
		EP 1409531 A2	21-04-2004
		WO 02068461 A2	06-09-2002
		HU 0303244 A2	29-12-2003
		US 2004063621 A1	01-04-2004
<hr/>			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/03629

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/29 C07K14/415 C07K16/16 A61K38/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X, L	WO 02/068461 A (THURIEAU CHRISTOPHE ;FERRANDIS ERIC (FR); TENG BENG POON (FR); SOD) 6 septembre 2002 (2002-09-06) cité dans la demande L: priorité le document en entier -----	1-3, 5-18

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 avril 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/05/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/03629

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02068461 A	06-09-2002	FR 2821359 A1	30-08-2002
		BR 0207578 A	02-03-2004
		CA 2437516 A1	06-09-2002
		EP 1409531 A2	21-04-2004
		WO 02068461 A2	06-09-2002
		HU 0303244 A2	29-12-2003
		US 2004063621 A1	01-04-2004
<hr/>			